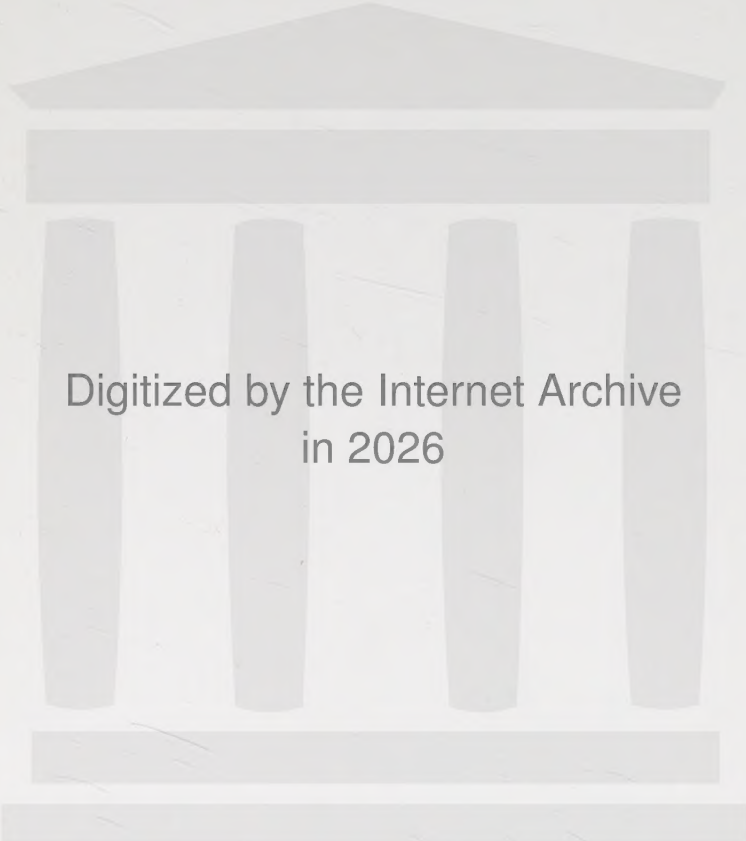


GENETISCHE UND BIOCHEMISCHE
CHARAKTERISIERUNG
PAROMOMYCIN-RESISTENTER MUTANTEN
DER HEFE
SACCHAROMYCES CEREVISIAE

Regina Beinker-Kutzleb

1974



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41554606_0027

Aus dem
Institut für Genetik der Universität München
Direktor: Prof. Dr. F. Kaudewitz

GENETISCHE UND BIOCHEMISCHE CHARAKTERISIERUNG
PAROMOMYCIN - RESISTENTER MUTANTEN DER HEFE
SACCHAROMYCES CEREVISIAE

INAUGURAL - DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades der
Fakultät für Biologie
der Ludwig - Maximilians - Universität
München

vorgelegt von
Regina Beinker-Kutzleb

München 1974



1. Berichterstatter: Prof. Dr F. Kaudewitz

2. Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. H. Schmieger

Tag der mündlichen Prüfung: 25. Juli 1974

INHALTSVERZEICHNIS

EINLEITUNG	1
Arbeitsplan	8

ERGEBNISSE

1. "in vivo"-Hemmung durch Paromomycin und Neomycin .	10
2. Isolierung Paromomycin-resistenter Mutanten	14
3. "in vivo" - Wirkung von Paromomycin und Neomycin auf die Paromomycin-resistenten Mutanten	15
4. Genetische Charakterisierung	
a) Mitotische Segregation	18
b) Petite-Induktion durch Ethidiumbromid	21
c) Tetradenanalyse	24
5. Isolierung von Neomycin-resistenten, Paromomycin- sensiblen Mutanten	27
6. Aminosäure-Einbau durch isolierte Mitochondrien .	28

DISKUSSION	39
----------------------	----

MATERIAL UND METHODEN

1) Hefestämme	45
2) Medien	45
3) Methoden	50

LITERATURVERZEICHNIS	57
--------------------------------	----

ZUSAMMENFASSUNG	65
---------------------------	----

E I N L E I T U N G

Es kann heute als gesichert angesehen werden, daß Mitochondrien ein zumindest teilweise autonomes System innerhalb der Zelle darstellen. Als Bestätigung dafür gilt insbesondere der Aminosäure-Einbau durch isolierte Mitochondrien, der bereits von mehreren Arbeitsgruppen untersucht wurde (Mc Lean et al. 1958; Reis et al. 1961; Roodyn et al. 1962; Kroon 1963; Wintersberger 1965; Grivell 1967; Lamb et al. 1968; Linnane et al. 1968a; Sebald et al. 1969). Es herrschten jedoch zunächst Zweifel, ob dieser tatsächlich das Resultat eines mitochondrialen Proteinsynthesesystems ist oder im Versuch durch eine Kontamination durch Mikrosomen oder andere subzelluläre nicht-mitochondriale Partikel oder Bakterien vorgetäuscht wird. Die unterschiedliche Wirkung von Antibiotika auf cytoplasmatische und mitochondriale Proteinsynthese bot eine Möglichkeit, diese beiden Systeme von einander zu trennen. Der Einbau markierter Aminosäuren, der den Mitochondrien zugeschrieben wurde, erwies sich als hemmbar durch Zugabe von Chloramphenicol, einem Antibiotikum, das an bakteriellen Ribosomen angreift und die Bildung funktionsfähiger Mitochondrien verhindert (Lamb et al. 1968). Der Ausschluß einer bakteriellen Proteinsynthese war auf diesem Wege unmöglich, da Mitochondrien und Bakterien durch die gleichen Antibiotika gehemmt werden.

Zur endgültigen Klärung des Vorhandenseins einer mitochondrialen Proteinsynthese dienten "in vivo"-Versuche,

die den Vorteil haben, daß eine Kontamination durch fremde proteinsynthetisierende Partikel wie Bakterien oder cytoplasmatische Ribosomen weitgehend ausgeschaltet werden kann. Spezifische Blockierung der cytoplasmatischen Ribosomen durch Cycloheximid (Siegel und Sisler 1967) ermöglicht es, in diesem System selektiv den Aminosäure-Einbau mitochondrialer Ribosomen zu untersuchen (Sebald et al. 1969; Küntzel 1969; Schweyen und Kaudewitz 1971). Aus der Tatsache, daß Mitochondrien ein eigenes Proteinsynthesystem besitzen, das jedoch nur einen kleinen Teil der mitochondrialen Proteine synthetisiert, ergibt sich die Frage, welche der mitochondrial synthetisierten Komponenten auf der mitochondrialen DNS kodiert sind. Eine Aussage darüber läßt die Anwendung genetischer Methoden, und zwar die Isolierung und Analyse mitochondrialer Mutanten erwarten.

Man unterscheidet bei Saccharomyces cerevisiae bisher zwei Gruppen mitochondrialer Mutanten: petite-Mutanten und Resistenz-Mutanten.

a) petite-Mutanten

Vor etwa 20 Jahren wurden von Ephrussi et al. (1953) atmungsdefekte Mutanten isoliert, die einen extrachromosomalen Vererbungsmodus aufwiesen. Sie wurden auf Grund ihrer Eigenschaft, kleinere Kolonien zu bilden, mit "petite" bezeichnet. Der extrachromosomale, die Atmungskompetenz-bedingende Faktor, erhielt die Bezeichnung ϕ , (Sherman 1963). (Bei atmungsdefekten Mutante tritt er

definitionsgemäß in verändertem Zustand $\mathcal{G}^-$ auf). Da petite-Mutanten oft eine Veränderung der Dichte mitochondrialer DNS aufweisen (Monolou et al. 1966), nahm man an, daß die Atmungsdefizienz auf einer Veränderung der mitochondrialen DNS beruht.

b) Resistenz-Mutanten

Viele Antibiotika sind seit langem als Hemmstoffe der Proteinsynthese bei Bakterien bekannt. Sie blockieren durch Anlagerung an das Ribosom die Translation und als Folge davon die Proteinsynthese (Weisblum und Davies 1968; Schlesinger 1969; Pestka 1971). Auf Grund ihrer Wirkung auf das Ribosom lassen sich die Antibiotika in zwei Gruppen einteilen. Man unterscheidet zwischen solchen, die an der 30S Untereinheit und denen, die an der 50S Untereinheit des Ribosoms angreifen. Zur ersten Gruppe gehören die aminoglycosiden Antibiotika wie z.B. Streptomycin, Paromomycin, Neomycin und Kanamycin, wobei Streptomycin in seiner Wirkungsweise besonders gut untersucht ist (Davies et al. 1964; Gorini et al. 1967; Kaij und Tanaka 1968). Die Antibiotika Chloramphenicol, Lincomycin und die macroliden Antibiotika z.B. Erythromycin, Spiramycin und Carbomycin lagern sich dagegen an der 50S Untereinheit des Ribosoms an (Apirion 1967; Krembel und Apirion 1968).

Hefezellen sind besonders geeignete Versuchsobjekte um die selektive Wirkung antibakterieller Antibiotika auf die mitochondriale Proteinsynthese nachzuweisen. Als fakultative Anaerobier können sie sowohl durch Gärung, als auch

durch Atmung Energie gewinnen. Im ersten Fall läuft der Abbau des Substrats im Cytoplasma, im zweiten Fall in wesentlichen Teilen in den Mitochondrien ab. Zur Energiegewinnung befähigte Mitochondrien können nur dann gebildet werden, wenn die mitochondriale Proteinsynthese funktionsfähig ist. Bei Blockierung dieser Proteinsynthese ist die Energiegewinnung daher nur noch durch den Abbau vergärbbarer Substrate, z.B. Glukose möglich. Einige der oben genannten Hemmstoffe bakterieller Proteinsynthese reduzieren nur das Wachstum von Hefezellen in nicht vergärbarem Substrat (Äthanol, Glyzerin). Daraus wurde abgeleitet, daß sie bei Hefen eine selektive Wirkung auf das mitochondriale Proteinsynthesystem ausüben (Clark-Walker und Linnane 1966). Resistente Mutanten sind dadurch charakterisiert, daß die Zellen in Gegenwart des Antibiotikums sowohl Glukose, als auch Glyzerin als Substrat zur Energiegewinnung zu nutzen vermögen.

Mitochondriale Mutanten bei Saccharomyces cerevisiae, die sich resistent gegen das Antibiotikum Erythromycin erwiesen, wurden zuerst von Linnane et al. (1968b) und Thomas und Wilkie (1968a) beschrieben. Die Resistenz gegen dieses Antibiotikum kann sowohl auf einer Permeabilitätsänderung der Zellmembran als auch auf einer Veränderung der Ribosomen selbst beruhen (Dunn et al. 1970; Grivell et al. 1971a; Trembath et al. 1973). Gut untersucht sind ferner extrachromosomale Resistenz-Mutanten gegen Chloramphenicol (Clark-Walker und Linnane 1966) und gegen Spiramycin (Trembath et al. 1973).

Mit Hilfe solcher Resistenz-Mutanten gelang es Rekombination zwischen mitochondrialen Markern nachzuweisen (Thomas und Wilkie 1968b) und die Genetik der Mitochondrien zu analysieren (Coen et al. 1970; Bolotin et al. 1971). Die letztere Arbeitsgruppe stellte bei Rekombinationsexperimenten zwischen den Markern für Erythromycin- und Chloramphenicol-Resistenz fest, daß die mitochondriale Rekombination durch das Auftreten von polaren und nicht-polaren Kreuzungen gekennzeichnet sein kann. Diese Polarität ist bedingt durch einen mitochondrialen Faktor, der mit ω bezeichnet wird (ω^+ bzw. ω^-). In heterosexuellen Kreuzungen ($\omega^+ \times \omega^-$) treten in den Diploiden vorwiegend Marker des ω^+ -Partners auf, während in den homosexuellen Kreuzungen ($\omega^+ \times \omega^+$, $\omega^- \times \omega^-$) dieser mitochondriale Faktor wahrscheinlich keine Rolle spielt. Dadurch wird deutlich, daß die Rekombinationshäufigkeit von der Art der Kreuzung (hetero- bzw. homosexuell) abhängig ist, was bei einer Kartierung der mitochondrialen DNS unbedingt berücksichtigt werden muß. Avner (1973) befaßte sich mit der Kartierung eines weiteren mitochondrialen Markers, der Oligomycin-Resistenz, unter Berücksichtigung der oben beschriebenen Fakten. Danach gibt es für die Oligomycin-Resistenz zwei verschiedene Genorte, die nicht mit den Genorten für Chloramphenicol- und Erythromycin-Resistenz gekoppelt sind.

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß auch bei Mitochondrien ein selbständiges genetisches System nachgewiesen

werden konnte. Die Anzahl der bisher bekannten Genloci auf der mitochondrialen DNS ist jedoch klein, und daher sind die Angaben über den mitochondrialen Informationsgehalt noch sehr unvollständig. Für eine weitere Kartierung der mitochondrialen DNS ist es somit notwendig, neue mitochondriale Mutanten zu isolieren, deren Eigenschaften entfernt von den bisher bekannten kodiert sind.

Aufgabe der vorliegenden Arbeit war es daher, Mutanten zu isolieren, die zur Erweiterung der Kenntnisse des mitochondrialen Informationsgehaltes dienen können. Als geeignet erschienen dafür aminoglycoside Antibiotika, die im Gegensatz zu den bisher für die Kartierung genutzten Antibiotika Erythromycin und Chloramphenicol an der kleinen Untereinheit des Ribosoms angreifen.

Mit der Wirkung verschiedener aminoglycosider Antibiotika auf Saccharomyces cerevisiae befaßte sich die Arbeitsgruppe um Linnane bereits ausführlich (Davey et al. 1970). Sie testeten die Wirkung von Neomycin, Paromomycin, Kanamycin, Neamin, Streptomycin und Viomycin auf die mitochondriale und die cytoplasmatische Proteinsynthese von Saccharomyces cerevisiae. Aus ihren Ergebnissen ging hervor, daß auch die Aminoglycoside nur auf atmende Zellen eine Wirkung haben, während bei gärenden Zellen erst eine hohe Antibiotika-Konzentration eine geringe Wachstums- hemmung bedingt. Die Unterscheidung zwischen der Wirkung auf die mitochondriale und die cytoplasmatische Proteinsynthese war jedoch nicht so signifikant, wie sie in an-

deren Arbeiten dieser Arbeitsgruppe z.B. für Chloramphenicol beschrieben worden war (Clark-Walker und Linnane 1966). Daher hielten die Autoren die untersuchten Aminoglycoside nicht für geeignet, Resistenz-Mutanten zu isolieren. Im Gegensatz dazu waren bereits von Thomas und Wilkie (1968b) Paromomycin-resistente Mutanten beschrieben worden.

Arbeitsplan:

Die bisher für die Kartierung der mitochondrialen DNS geeigneten Resistenz-Mutanten betreffen die Antibiotika Chloramphenicol, Erythromycin und Oligomycin. Die Genorte der erstgenannten sind eng gekoppelt, für Oligomycin-Resistenz sind zwei verschiedene Genloci bekannt. Oligomycin ist ein Hemmstoff der oxydativen Phosphorylierung, das Macrolid Erythromycin hemmt die Proteinsynthese bei Bakterien, indem es an der 50S Untereinheit des Ribosoms angreift. Aufgabe der vorliegenden Arbeit ist es, weitere für die Kartierung und damit Analyse des Kodierungsgehaltes der mitochondrialen DNS geeignete Mutanten zu isolieren. Von den aminoglycosiden Antibiotika wie Paromomycin und Neomycin ist bekannt, daß sie an der 30S Untereinheit des Ribosoms angreifen und auch bei Hefen selektiv mitochondriale Funktionen hemmen. Resistenz gegen ein Antibiotikum, das an die 30S Untereinheit des Ribosoms bindet, ist wahrscheinlich auf eine Veränderung in dem Abschnitt der mitochondrialen DNS zurückzuführen, der die 30S Untereinheit kodiert.

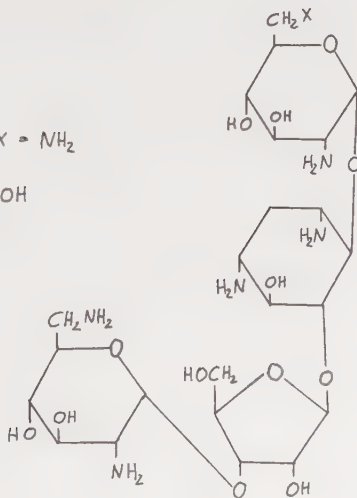
Daher sollen bei Saccharomyces cerevisiae Resistenz-Mutanten gegen die Antibiotika Paromomycin und Neomycin isoliert werden, die sich sowohl "in vivo" als auch "in vitro" resistent verhalten. Da die Mutanten zur weiteren Kartierung der mitochondrialen DNS herangezogen werden sollen, gilt das besondere Interesse solchen Mutanten, bei denen die Resistenz extrakaryotisch, und zwar mitochondrial vererbt wird.

ERGEBNISSE

Um zu prüfen, ob die beiden Antibiotika Paromomycin und Neomycin für die Aufgabe, mitochondriale Resistenz-Mutanten zu isolieren, geeignet sind, wurde ihre Wirkung auf das Wachstum von Saccharomyces cerevisiae Wildtypzellen in Glukosemedium (Energiegewinnung im Cytoplasma) und in Glyzerinmedium (Energiegewinnung in den Mitochondrien) untersucht. Diese beiden Antibiotika wurden ausgewählt, da sie nach den Untersuchungen von Davey et al. (1970) die günstigsten Werte für eine Trennung zwischen mitochondrialer und cytoplasmatischer Proteinsynthese zeigten. Paromomycin und Neomycin haben eine sehr ähnliche Struktur:

Paromomycin: $X = \text{NH}_2$

Neomycin: $X = \text{OH}$



1. "in vivo" - Hemmung durch Paromomycin und Neomycin:

Auf Abbildung 1 a) und b) ist die Wirkung des Antibiotikums Paromomycin auf das Wachstum von Wildtypzellen in Medium mit und ohne vergärbare Kohlenstoffquelle bei verschiedenen Antibiotika-Konzentrationen dargestellt. Dazu wurden Zellen des Wildtypstammes M12 in Glyzerin- bzw. Glukosemedium mit Paromomycin-Konzentrationen von 0 - 1000 µg/ml geschüttelt und zu bestimmten Zeiten durch Messung der Extinktion der Titer bestimmt. Bei atmenden Zellen bewirkt eine Zugabe von 50 µg Paromomycin/ml bereits eine fast gänzliche Hemmung der Zellvermehrung, während das Wachstum gärender Zellen bei Anwesenheit von 1000 µg Paromomycin/ml nur geringfügig gehemmt wird. Daraus geht hervor, daß das Aminoglycosid Paromomycin eine selektive Hemmung der mitochondrialen Proteinsynthese des Wildtypstammes M12 hervorruft. Die anfängliche Steigung der Wachstumskurven nach Zugabe des Antibiotikums ist darauf zurückzuführen, daß die Zellen in Glyzerinmedium ohne Antibiotikum vorgezüchtet wurden. Da Paromomycin die Proteinsynthese hemmt bewirkt es keinen sofortigen Wachstumsstillstand, vielmehr werden bereits begonnene Partikel zu Ende synthetisiert, sodaß zunächst noch durchschnittlich eine Zellteilung vorgenommen wird.

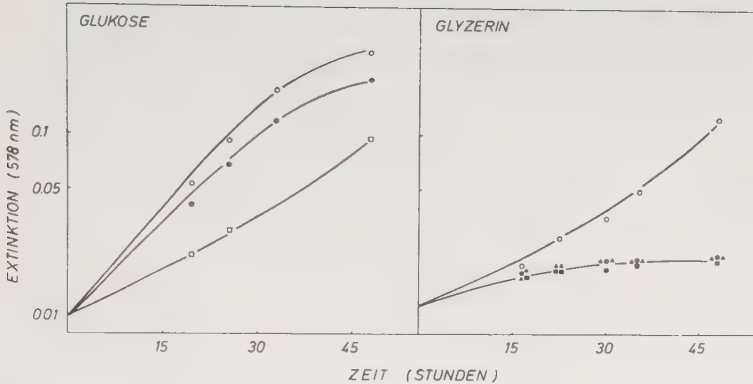


Abbildung 1 a) und b): Wirkung von Paromomycin auf das Wachstum des Paromomycin-sensiblen Stammes M12 in Glukose- (a) und Glyzerinmedium (b). Die Zellen wurden in YEP-Glyzerinmedium vorgezüchtet und Aliquots dieser Vor- kultur in YEP-Glyzerin- und YEP-Glukosemedium mit ver- schiedenen Paromomycin-Konzentrationen gegeben (10^6 Zellen/ ml). Zu bestimmten Zeiten wurde durch Messung der Extink- tion bei 578 nm der Titer bestimmt.

Paromomycin wurde in folgenden Konzentrationen zugegeben:
 0 ug ○—○ ; 50 ug ▲—▲ ; 100 ug ●—● ; 250 ug △—△ ;
 500 ug ■—■ ; 1000 ug □—□

Für die graphische Darstellung der Abbildung 2 wurde die Wirkung der Antibiotika in der logarithmischen Phase berücksichtigt und die Hemmung in Prozenten ausgedrückt. In Glycerinmedium, also bei atmenden Zellen bewirkt eine Zugabe von 30 µg Paromomycin/ml bereits eine Hemmung von 50% gegenüber der Wachstumsrate in Medium ohne Antibiotikum; eine Konzentration von 100 µg Paromomycin/ml hemmt die Zellvermehrung des Wildtyps vollständig. Im Vergleich dazu bleibt die Wachstumsrate in Glukosemedium, also bei gärenden Zellen, bis zu einer Konzentration von 100 µg Paromomycin/ml unverändert. Erst bei höheren Konzentrationen (300 - 3000 µg/ml) tritt auch in diesem Medium eine Hemmung ein, wobei aus einer Zugabe von 3000 µg Paromomycin/ml eine Hemmung von ca. 50% resultiert. Dieser Effekt ist wahrscheinlich darauf zurückzuführen, daß so hohe Antibiotika-Konzentrationen unspezifisch auf die Zellen einwirken und dadurch die Wachstumsrate verringert wird.

Die Wirkung des Antibiotikums Neomycin auf das Wachstum von Wildtypzellen entspricht grundsätzlich der des Antibiotikums Paromomycin. Jedoch zeigt Neomycin einen geringeren Effekt auf die Wachstumsrate atmender Zellen als Paromomycin. Dagegen ist die hemmende Wirkung auf gärende Zellen bei niedrigen Konzentrationen (30 - 100 µg/ml) größer. Das bedeutet, daß man mit Neomycin nicht so eindeutig zwischen cytoplasmatischer und mitochondrialer Proteinsynthese unterscheiden kann wie mit Paromomycin.

Insgesamt läßt sich aus diesen Versuchen erkennen, daß der hemmende Effekt der Aminoglycoside Paromomycin und Neomycin auf die mitochondriale Proteinsynthese bei Hefen mit dem von Erythromycin und Chloramphenicol vergleichbar ist. Aus diesem Grund sollte es möglich sein, auch gegen diese aminoglycosiden Antibiotika, besonders gegen Paromomycin, entsprechende Resistenz-Mutanten isolieren zu können.

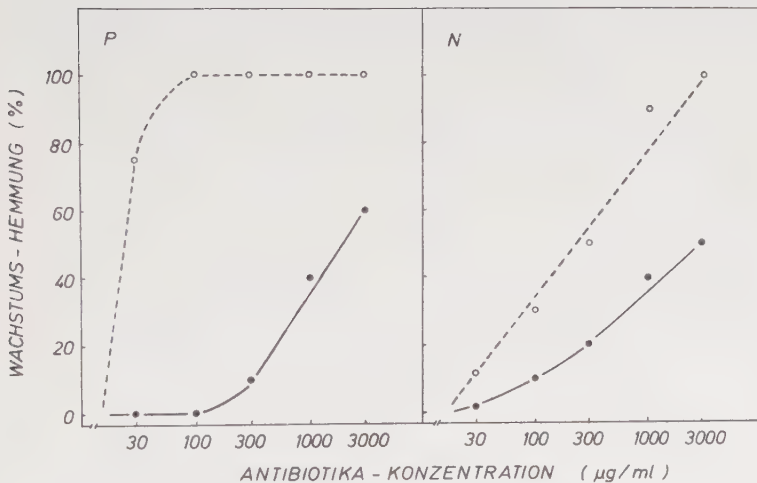


Abbildung 2: Wirkung von Paromomycin und Neomycin auf das Wachstum des Paromomycin-sensiblen Stammes M12 in vergärbarem und nicht vergärbarem Medium. Wachstumsbedingungen und Durchführung der Messung wie bei Abb.1. Die Daten für die Darstellung wurden aus mehreren Experimenten errechnet. P = Paromomycin, N = Neomycin; ○---○ YEP-Glyzerinmedium, ●—● YEP-Glukosemedium.

2. Isolierung von Paromomycin-resistenten Mutanten:

Auf Grund der oben beschriebenen Versuche erschienen das Antibiotikum Paromomycin und der Stamm M12 für die Isolierung von Resistenz-Mutanten als geeignet. Dieser Stamm zeigte sich in Glyzerinmedium sensibel gegen niedrige Paromomycin-Konzentrationen ($50 \mu\text{g/ml}$), in Glukosemedium dagegen wesentlich unempfindlicher auch gegen höhere Konzentrationen ($3000 \mu\text{g/ml}$ - 50% Hemmung). Ferner zeichnet sich der Stamm M12 durch eine relativ geringe spontane ϕ^- -Rate ($< 0,1\%$) aus, d.h. die mitochondriale DNS (mit-DNS) ist sehr stabil und daher besonders für Untersuchungen aus dem Gebiet der mitochondrialen Genetik geeignet. Die im Folgenden beschriebenen Mutanten wurden nicht mit einem Mutagen induziert, sondern entstanden spontan. Das hat meist den Vorteil, daß mit großer Wahrscheinlichkeit nur die Eigenschaft der Zellen verändert ist, auf die selektiert wurde. Durch Anwendung hoch aktiver Mutagene werden dagegen oft auch andere genetisch bedingte Funktionen der Zellen, die dann Mehrfachmutanten sind, in Mitleidenschaft gezogen.

Für die Selektion der Mutanten wurden auf mehrere Platten Paromomycin-Agar ($1000 \mu\text{g/ml}$) jeweils ca. 10^7 Zellen verteilt. Die spontane Mutationsrate betrug 5×10^{-7} . Von den isolierten Mutanten wurden diejenigen, welche sich auch gegen $2000 \mu\text{g}$ Paromomycin/ml resistent erwiesen, für die weiteren Untersuchungen herangezogen. (Sie wurden mit den Nummern 50 - 55 bezeichnet.)

3. "in vivo" - Wirkung von Paromomycin und Neomycin auf
die Paromomycin-resistenten Mutanten:

Die Abbildungen 3 a) und b) geben stellvertretend für alle untersuchten Mutanten, die Wachstumskurven einer Paromomycin-resistenten Mutante in Glukose- und Glyzerinmedium mit verschiedenen Antibiotika-Konzentrationen wieder. Daraus geht hervor, daß sich die Wachstumseigenschaften der Mutanten in nicht selektivem Medium gegenüber dem Wildtypstamm M12 (Abb. 1) unverändert verhalten und auch durch Zugabe von Paromomycin-Konzentrationen bis zu 2000 µg/ml nicht wesentlich beeinträchtigt werden.

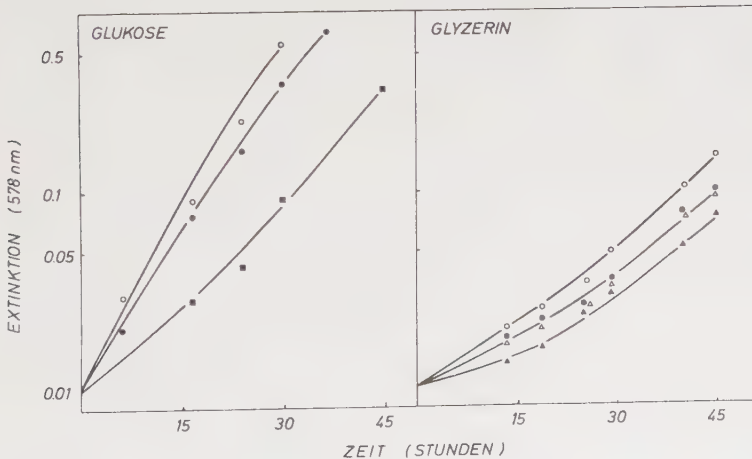


Abbildung 3 a) und b): Wirkung von Paromomycin auf das Wachstum der Paromomycin-resistenten Mutante 54 in Glukose- (a) und Glyzerinmedium (b). Wachstumsbedingungen und Versuchsdurchführung wie bei Abb.1. ○—○ 0 µg, ●—● 100 µg, △—△ 500 µg, ▲—▲ 2000 µg, ■—■ 3000 µg Paromomycin/ml.

In Tabelle 1 sind die Wachstumsraten der verschiedenen Stämme als Generationszeiten wiedergegeben, wobei die Generationsdauer aus der Zuwachsrates in der logarithmischen Wachstumsphase berechnet wurde. Die in der Tabelle 1 aufgeführten Werte zeigen, daß eine Zugabe von 30 µg Paromomycin/ml beim Wildtyp die Generationszeit auf den fast vierfachen Wert ansteigen läßt, während die der Mutante unbeeinflusst bleibt. Sie wird erst durch eine Konzentration von 1000 µg/ml um ca. 2 Std. (20%) erhöht. Beim Wildtyp dagegen erfolgt bei dieser Konzentration innerhalb der gesamten Versuchsdauer von 80 Std. keine Verdoppelung der Zellzahl. Eine Hemmung von ca. 50% wird bei den Mutanten in Medium ohne vergärbare Kohlenstoffquelle (Tabelle 1) und beim Wildtyp in Medium mit vergärbarer Kohlenstoffquelle (Abb. 2) durch Zugabe von 3000 µg Paromomycin/ml erreicht.

Die untersuchten Mutanten erwiesen sich weder gegen Erythromycin, Spiramycin, Chloramphenicol noch Oligomycin, sondern lediglich gegen Neomycin kreuzresistent. Jedoch geht aus den Werten der Tabelle 1 hervor, daß sich die Wirkung von Neomycin auf den Wildtyp nicht so signifikant von der auf die Mutante unterscheidet wie bei Paromomycin. Eine vollständige Hemmung des Wildtypwachstums wird erst durch eine Konzentration (3000 µg/ml) erreicht, die auch die Mutante bereits zu 50% hemmt. Auf Grund dieser Tatsache erscheint Neomycin im vorliegenden Fall weniger geeignet, was auch aus Abb. 2 zu erkennen war.

Antibiotikum	$\mu\text{g/ml}$	Generationszeit (Std.)		
		M12 P ^S	54 P ^R	55 P ^R
Paromomycin	0	7,5	7,5	7,5
	30	28	7,5	8
	100	80	8	8,5
	300	80	8	9
	1000	80	9	10
	3000	80	11	12,5
Neomycin	0	8	7,5	6,5
	30	9	7,5	6,5
	100	11	8	7
	300	18	10	11,5
	1000	60	12,5	13
	3000	80	15	15

Tabelle 1: Wirkung von Paromomycin und Neomycin auf das Wachstum eines Paromomycin-sensiblen Stammes M12 und zwei resistenten Mutanten (54; 55) in Medium mit und ohne vergärbare Substrat. Die Paromomycin-sensiblen Zellen wurden in YEP-Glyzerinmedium und die Paromomycin-resistenten Mutanten in YEP-Glyzerinmedium mit einer Konzentration von 1000 μg Paromomycin/ml vorgezüchtet. Die weitere Versuchsdurchführung erfolgte entsprechend den Angaben zu Abb. 1. Für die Berechnung der Generationszeiten wurden die Wachstumsraten in der logarithmischen Phase herangezogen. Die angegebenen Werte wurden aus mehreren Experimenten abgeleitet.

4. Genetische Charakterisierung der Mutanten:

Die meisten der bisher bekannt gewordenen extrakaryotischen Mutationen bei Saccharomyces cerevisiae betreffen die mit-DNS. Zum Nachweis des Vorliegens eines solchen extrakaryotischen Erbganges gibt es mehrere Möglichkeiten. In der vorliegenden Arbeit wurden zur genetischen Charakterisierung der Resistenz-Mutanten drei Kriterien untersucht, deren positiver Ausfall karyotische Vererbung ausschließt.

- a) das Auftreten der mitotischen Segregation der Resistenz
- b) das Fehlen der Resistenz nach Zerstörung der mit-DNS
- c) das Nicht-Aufspalten der Resistenz in der Tetradenanalyse nach der Meiose

a) Mitotische Segregation:

Als mitotische Segregation bezeichnet man in der mitochondrialen Genetik der Hefen die Tatsache, daß die diploiden Nachkommen einer Zygote in der Mitose beide elterlichen Marker mit etwa gleicher Häufigkeit herausspalten. Dieses Phänomen wurde erstmals von Linnane et al. (1968b) beschrieben. Er beobachtete, daß bei der Kreuzung Erythromycin-resistenter Mutanten mit einem sensiblen Stamm unter den Diploiden sowohl resistente als auch sensible Zellen auftraten. Auf Grund dieser Erscheinung nahm er an, daß die Resistenz extrakaryotisch vererbt werden müsse, da bei einem karyotischen Erbgang der Resistenz entweder, bei Dominanz der Resistenz, alle Diploiden resistent oder im umgekehrten Falle alle sensibel sein müßten. (Ausnahmen: mitotische Rekombination und Genkonversion). Etwas ausführlicher mit

dem Auftreten der mitotischen Segregation beschäftigte sich die Arbeitsgruppe von Slonimski (Coen et al. 1970; Bolotin et al. 1971). Sie beobachteten, daß in einer Kreuzung die Marker der Diploiden in sehr unterschiedlichen Verhältnissen zueinander auftreten, wobei dieses Verhältnis für dieselbe Mutante je nach Kreuzungspartner variiert. Entweder treten die elterlichen Marker zu jeweils gleichen Teilen auf, wobei jedoch Schwankungen von 40 - 50% beschrieben werden, oder es sind vorwiegend die Marker eines Elterntyps, bis zu 98% bei Chloramphenicol-Resistenz, vertreten. Diese Tatsache veranlaßte die Autoren, die Stämme in zwei Gruppen einzuteilen. Stämme, deren Marker nach der mitotischen Segregation vorwiegend auftraten, wurden ω^+ , Stämme, deren Marker sich nur zu einem ganz geringen Prozentsatz in den diploiden Zellen ausprägten, entsprechend ω^- genannt. Eine Kreuzung zwischen einem ω^+ - und einem ω^- -Stamm bezeichneten sie als heterosexuell und Kreuzungen zwischen gleichen ω -Typen folglich als homosexuell. Die Transmission gibt das zahlenmäßige Auftreten der Parentaltypen wieder. Homosexuelle Kreuzungen zeigen geringe Polarität der Transmission, d.h. beide Elterntypen treten etwa gleich häufig auf. Im Gegensatz dazu zeichnen sich heterosexuelle Kreuzungen durch hohe Polarität der Transmission aus, d.h. ein Elterntyp tritt bevorzugt auf. Das bedeutet, daß der ω -Faktor die Transmissionshäufigkeit der mitochondrialen Marker bestimmt. In einer heterosexuellen Kreuzung werden Marker,

die nahe beim ω^+ - Faktor liegen, häufiger übertragen als Marker, die weiter entfernt sind. In homosexuellen Kreuzungen dagegen tritt ein solcher Effekt nicht auf.

Für die Untersuchungen der mitotischen Segregation bei den vorliegenden Mutanten wurden Zellen der resistenten Stämme 50 - 55 (a) mit dem sensiblen Stamm 1761 (α) diploidisiert und nach 20 Generationen, also nach Ablauf der mitotischen Segregation, die Diploiden auf Paromomycin-Resistenz getestet.

Kreuzung	diploide Kolonien	p^R	p^S
50 x 1761	1350	65%	35%
51 x 1761	1200	65%	35%
52 x 1761	850	60%	40%
53 x 1761	1480	63%	37%
54 x 1761	920	60%	40%
55 x 1761	750	64%	36%
M12 x 1761	890	0%	100%

Tabelle 2: Segregation der Resistenz und Sensibilität gegen Paromomycin der diploiden Nachkommenschaft der Zygoten, die aus haploiden resistenten und sensiblen Zellen gebildet wurden.

Aus Tabelle 2 geht hervor, daß die Kreuzungen der Paromomycin-resistenten Mutanten mit einem sensiblen Stamm mitotische Segregation zeigen. Es handelt sich hierbei um eine homosexuelle Kreuzung. Die Transmission des resistenten Allels beträgt 60 - 65%. Das liegt im Bereich der Werte, die für eine homosexuelle Kreuzung zu erwarten sind.

Das Auftreten der mitotischen Segregation dient als erster Hinweis dafür, daß bei den vorliegenden Mutanten die Paromomycin-Resistenz extrakaryotisch vererbt wird.

b) Petite - Induktion durch Ethidiumbromid:

Die Wirkungsweise des Mutagens Ethidiumbromid beruht auf einer Komplexbildung mit der DNS, wodurch die DNS-Polymerase und demzufolge auch die DNS-abhängige RNS-Polymerase gehemmt werden (Waring 1964; LePecq und Paoletti 1967). Bauer und Vinograd (1968) und Piko et al. (1968) konnten zeigen, daß Ethidiumbromid nur an ringförmige DNS-Moleküle bindet. Ferner wurde von Slonimski et al. (1968) beschrieben, daß atmungskompetente Hefezellen durch Zugabe von Ethidiumbromid quantitativ atmungsdefekt werden. Diese beiden Fakten legen die Vermutung nahe, daß Ethidiumbromid spezifisch an mit-DNS angreift und daher zur Trennung von Kern- und mit-DNS-Synthese geeignet ist. Goldring et al. (1970) wiesen nach, daß bei Saccharomyces cerevisiae die Kern-DNS im Gegensatz zur mit-DNS durch Zugabe von Ethidiumbromid (10 µg/ml) nicht merklich verändert wird. Die mit-DNS-

Synthese sinkt dagegen auf 10% des Kontrollwertes. Die mit-DNS-Moleküle werden während der Inkubation immer kleiner; bereits vorhandene DNS wird stufenweise abgebaut, so daß nach einer Inkubationsdauer von 14 Std. keine mit-DNS mehr nachgewiesen werden kann. Daraus folgt, daß ϕ^- -Mutanten, die durch Ethidiumbromid induziert wurden, keine mit-DNS besitzen, wenn die Inkubation über einen längeren Zeitraum durchgeführt wurde. Im Gegensatz dazu kann bei spontan entstandenen ϕ^- -Zellen noch mit-DNS nachgewiesen werden.

Die Tatsache, daß durch petite - Induktion die mit-DNS vollständig eliminiert werden kann, benutzte Linnane (1968)b für die genetische Charakterisierung Erythromycin-resistenter Mutanten. Er ging dabei von folgender Überlegung aus: Ist eine Mutation auf der mit-DNS kodiert, dürfte sie nach petite - Induktion nicht mehr nachweisbar sein, es sei denn, sie liegt auf einem Abschnitt der mit-DNS, der während der Inkubation nicht zerstört worden ist. Bei Kodierung einer zur Resistenz führenden Mutation durch Kern-DNS müßte die Mutante trotz Behandlung mit Ethidiumbromid weiterhin resistent bleiben. Bei Antibiotika-resistenten Mutanten läßt sich jedoch das Vorhandensein, bzw. der Verlust der Resistenz in den durch petite - Induktion entstandenen ϕ^- -Zellen nicht nachweisen, da das Antibiotikum nur auf atmende Zellen eine Wirkung zeigt, während ϕ^- -Zellen nur auf Medium mit vergärbarem Substrat zu wachsen vermögen. Linnane diploidisierte daher die isolierten ϕ^- -Zellen

der resistenten Mutanten mit Zellen eines sensiblen atmungs-kompetenten Stammes und testete die Diploiden auf Resistenz und Atmungskompetenz.

Die vorliegenden Mutanten sind vergleichbar mit denen, die von Linnane beschrieben wurden. Auch das Antibiotikum Paromomycin wirkt nur bei atmenden Zellen. Daher wurden zur weiteren genetischen Analyse bei den Paromomycin-resistenten Mutanten durch Ethidiumbromid ϕ^- -Zellen induziert und mit einem Paromomycin-sensiblen atmungskompetenten Stamm diploidisiert. Von diesen Diploiden wurden jeweils etwa 100 getestet. Alle waren zwar atmungskompetent, wiesen aber in keinem Falle Paromomycin-Resistenz auf. Gleiche Ergebnisse wären zu erwarten, wenn die Paromomycin-Resistenz auf einer rezessiven Veränderung des Kern-Genoms beruhen würde. Diese Möglichkeit wurde jedoch bereits durch das Auftreten der mitotischen Segregation ausgeschlossen, wobei sowohl sensible als auch resistente Diploide beobachtet werden konnten. Daraus geht hervor, daß die Information für die Resistenz durch petite - Induktion verloren gegangen ist. Auf Grund dieser Tatsache darf man annehmen, daß bei den beschriebenen Mutanten die Mutation zur Paromomycin-Resistenz durch Veränderung mit-DNS bedingt ist.

Der von Goldring (1970) beschriebene stufenweise Abbau der mit-DNS durch Ethidiumbromid ließe erwarten, daß nach kurzer Inkubationsdauer bei manchen ϕ^- -Zellen die Paromomycin-Resistenz noch erhalten geblieben sein müßte. Im vorliegenden Fall wurde jedoch die Inkubation über eine

Dauer von 15 Std. durchgeführt, da der Ausgangsstamm (M12) der Mutanten eine sehr geringe spontane ϕ^- -Rate aufweist, sodaß nach petite - Induktion unter nicht-wachsenden Bedingungen von nur 5stündiger Dauer sehr wenige atmungsdefekte Zellen isoliert werden konnten. Für eine ausreichende Statistik war jedoch eine größere Anzahl von ϕ^- -Zellen notwendig; daher wurde entsprechend eine Inkubationsdauer gewählt, bei der ein totaler Abbau der mit-DNS zu erwarten war.

Die Ergebnisse der petite - Inkubation durch Ethidiumbromid stehen im Einklang mit der Hypothese, daß die Paromomycin-Resistenz der untersuchten Mutanten extrakaryotisch und zwar mitochondrial vererbt wird.

c) Tetradenanalyse:

Eine weitere Methode zur genetischen Charakterisierung ist die Tetradenanalyse. Dazu wurden die Paromomycin-resistenten Mutanten (a) mit einem Paromomycin-sensiblen Stamm (α) diploidisiert und nach der Meiose und Sporulation eine Analyse der Tetraden durchgeführt. Die Kreuzungspartner müssen außerdem verschiedene Auxotrophien besitzen, die karyotisch vererbt werden, sodaß sie bei der Analyse als Kontrolle dienen können. Bei einem extrakaryotischen Vererbungsmodus der Paromomycin-Resistenz sollten entweder alle Sporen einer Tetrade resistent oder alle sensibel sein. Tetraden mit ausschließlich sensiblen Sporen treten

dann auf, wenn vor der Sporulation nicht auf resistente Diploide selektiert wurde und somit auch sensible Diploide, die durch die mitotische Segregation auftreten, zur Tetradenbildung kamen. Die karyotisch vererbten Auxotrophien sollten dagegen in einem Verhältnis von 2 : 2 auftreten, was bei allen untersuchten Tetraden der Fall war.

Kreuzung	vollständige Tetraden	P-resistent : P-sensibel		
		4 : 0	0 : 4	3 : 1
50 x 3oIIIf	8	5	1	2
51 x 3oIIIf	7	3	3	1
52 x 3oIIIf	11	3	6	2
53 x 3oIIIf	9	5	3	1
54 x 3oIIIf	9	4	2	3
55 x 3oIIIf	10	5	3	2

Tabelle 3: Tetradenanalyse nach der Meiose bei Kreuzungen zwischen den Paromomycin-resistenten Mutanten 50 - 55 und dem Paromomycin-sensiblen Stamm 3oIIIf.

Der größte Teil der Tetraden zeigte keine Aufspaltung in resistente und sensible Sporen; sie enthielten entweder ausschließlich resistente oder sensible Sporen (Tabelle 3). Ein kleiner Teil der Tetraden spaltete jedoch im Verhältnis 3 : 1. Wurden diese sensiblen Sporen mit einem Paromomycin-sensiblen Stamm gekreuzt so traten wiederum resis-

tente Diploide auf. Das deutet darauf hin, daß auch in der sensiblen Spore die Information für die Paromomycin-Resistenz noch vorhanden ist, jedoch durch andere, wahrscheinlich karyotische, Gene unterdrückt wird. Da dieser Effekt nur in haploiden Zellen beobachtet wurde, darf man annehmen, daß die Wirkung dieser Gene rezessiv ist. Auf Grund dieser weiteren Untersuchungen ließ sich somit zeigen, daß in diesem Fall eine Aufspaltung der Tetraden von 3 : 1 nur scheinbar ist und in Wirklichkeit keine Aufspaltung in resistente und sensible Sporen bedeutet.

Diese Ergebnisse der Tetradenanalyse lassen den Schluß zu, daß die Vererbung der Paromomycin-Resistenz bei den vorliegenden Mutanten einem nicht-mendelnden Erbgang entspricht. Sie sind jedoch allein nicht ausreichend als Beweis für eine extrakaryotische Vererbung der Resistenz. Erst im Zusammenhang mit den Ergebnissen der beiden bereits beschriebenen Methoden: Auftreten der mitotischen Segregation und der Verlust der Resistenz durch petite-Induktion, läßt sich eindeutig nachweisen, daß die Paromomycin-Resistenz der untersuchten Mutanten extrakaryotisch und zwar mitochondrial vererbt wird.

5. Isolierung von Neomycin-resistenten, Paromomycin-sensiblen Mutanten:

Die in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Paromomycin-resistenten Mutanten hatten sich alle kreuzresistent gegen Neomycin erwiesen. Um die Frage zu klären, ob beide Resistenzen immer gemeinsam auftreten, wurde der Versuch unternommen, auf Neomycin-Medium resistente Mutanten zu isolieren und ihre Paromomycin-Sensibilität zu prüfen. Von einem Stamm, (1625C₁) der eine besonders ausgeprägte Paromomycin- und Neomycin-Sensibilität aufweist, wurde auf Neomycin-Medium (4mg Neomycin/ml) eine Reihe spontan auftretender Mutanten isoliert. Bei allen war jedoch die Resistenz gegen Neomycin von einer schwachen Paromomycin-Resistenz begleitet. Da, wie bereits im vorausgehenden Kapitel dargelegt, Kerngene einen die mitochondriale Resistenz modifizierenden Einfluß ausüben können, wurde durch Umkreuzung versucht, die Neomycin-Resistenz unter den Einfluß eines veränderten Kerngenoms zu stellen. Unter 40 Sporenisolaten zeigten 9 einen klaren Neomycin-resistenten, Paromomycin-sensiblen Phänotyp.

Somit kann die Tatsache, daß Neomycin- und Paromomycin-Resistenz nicht grundsätzlich gekoppelt auftreten, als Hinweis dafür dienen, daß die Veränderung der mit-DNS, welche die Paromomycin-Resistenz bedingt, nicht identisch mit derjenigen sein muß, welche die Neomycin-Resistenz hervorruft.

6. Aminosäure-Einbau durch isolierte Mitochondrien:

Das Auftreten der Resistenz gegen ein Antibiotikum, das die mitochondriale Proteinsynthese hemmt, läßt sich physiologisch grundsätzlich auf zwei Arten erklären. Die Resistenz kann einmal auf einer Veränderung der Zell- oder Mitochondrienmembran beruhen, sodaß das Antibiotikum gar nicht in die Zelle bzw. das Mitochondrium gelangen kann. Entsprechende Mutanten bei Saccharomyces cerevisiae wurden von Bunn et al. (1970) und Trembath et al. (1973) beschrieben. Solche Mutanten zeigen Kreuzresistenzen gegen mehrere andere Antibiotika. Aus ihnen isolierte Mitochondrien ("in vitro" - Experiment) erweisen sich dabei als sensibel. Die Antibiotika-Resistenz kann jedoch auch durch eine Veränderung in den Mitochondrien bedingt sein. Mutanten dieser Art zeigen keine oder nur wenige Kreuzresistenzen, ferner bleibt auch bei isolierten Mitochondrien die Resistenz erhalten (Wilkie 1970; Grivell et al. 1971a; Trembath et al. 1973). Tanaka et al. (1968) konnten bei Erythromycin-resistenten Bakterien ein verändertes ribosomales Protein nachweisen. Entsprechend den Analogien zwischen bakteriellern und mitochondrialem Proteinsynthesystem, wurden auch bei einer extrakaryotischen Resistenz-Mutante von Saccharomyces cerevisiae eine Veränderung mitochondrialer Ribosomen beschrieben (Grivell et al. 1971a).

Um eine Aussage machen zu können, ob die Resistenz der vorliegenden Mutanten auf einer Membranveränderung beruht,

oder ob sie durch eine Veränderung in den Mitochondrien bedingt wird, wurde die Wirkung des Antibiotikums auf den Aminosäure-Einbau isolierter Mitochondrien des Wildtyps und der Mutante untersucht.

Bei "in vitro" - Systemen unterscheidet man zwischen exogenen und endogenen Systemen der Energielieferung. Im Falle eines exogenen Systems wird eine Energie (ATP) -regenerierendes System von außen zugeführt (Phosphoenolpyruvat + Pyruvatkinase $\rightarrow$ Pyruvat + ATP). In einem endogenen System erfolgt die Energiegewinnung durch den Abbau spezifischer Substrate über Atmung und oxydative Phosphorylierung. Dabei ist zwar die Rate des Aminosäure-Einbaus geringer als bei Systemen, denen Energie zugeführt wird (Lamb et al. 1968), es dient jedoch gleichzeitig als Nachweis für die Intaktheit der verwendeten Mitochondrien. Außerdem ist die Wahrscheinlichkeit, daß der Aminosäure-Einbau durch eventuell vorhandene cytoplasmatische Ribosomen bedingt wird, sehr gering.

In der vorliegenden Arbeit wurde ein endogenes System (Grivell 1967) mit den Substraten α -Ketoglutarat, Pyruvat und Malat benutzt. Die Zugabe von ADP sollte die oxydative Phosphorylierung und somit die Bildung von ATP stimulieren. Als Nachweis für die Intaktheit der isolierten Mitochondrien wurde die Stimulierung der Atmung durch Zugabe von ADP nach der polarographischen Methode von Estabrook (1967) untersucht. Dabei erwies sich die Veratmung von NADH (Abb. 4a) bzw. von α -Ketoglutarat, Pyruvat und Malat (Abb. 4b) als

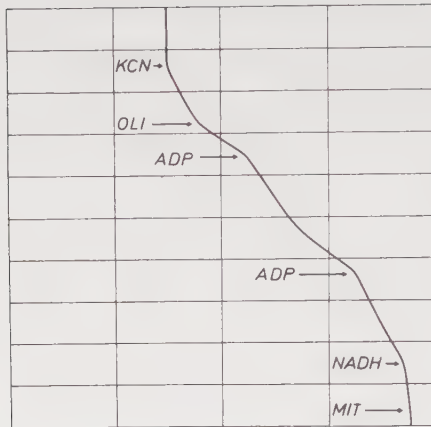
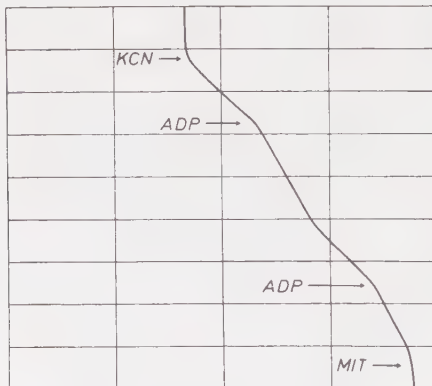


Abbildung 4: Stimulierung der Atmung isolierter Mitochondrien (nach Estabrook 1967). Zugaben: ADP (0,1M 1.) 20 μ l, 2.) 200 μ l, Oligomycin 5 μ g, KCN (90 mM) 10 μ l.
a) Substrat: NADH



b) Substrate: α -Ketoglutarat, Pyruvat, Malat.

stimulierbar durch ADP, wobei die Dauer der Stimulierung proportional der ADP-Konzentration war. Die P/O Rate der isolierten Mitochondrien betrug jeweils 1,5 - 2,5. Die Stimulierung zeigte sich hemmbar durch Oligomycin, einem spezifischen Hemmstoff der oxydativen Phosphorylierung. Ferner ließ sich die Atmung durch Zugabe von Cyanid oder Antimycin A vollständig hemmen. Daraus geht hervor, daß die isolierten Mitochondrien noch in der Lage sind, über Atmung und oxydative Phosphorylierung Energie zu gewinnen.

Für die Untersuchung der Wirkung von Paromomycin auf den Aminosäure-Einbau "in vitro" wurden zunächst aus den Zellen des Wildtypstammes M12 und der Mutante 54 Mitochondrien isoliert. Das geschah durch Bildung von Protoplasten mit Schneckenenzym (Glucoronidase) und anschließender osmotischer Lyse, worauf die Gewinnung der Mitochondrien durch differentielle Zentrifugationen folgte (siehe "Methoden"). Die so erhaltenen Mitochondrien wurden sofort in Inkubationsmedium mit verschiedenen Antibiotikakonzentrationen (0 - 1000 µg/ml) ca. 10 Min. vorinkubiert. Zum Zeitpunkt 0 Min. (Abb. 5) erfolgte die Zugabe von 14 C-Phenylalanin. Die Rate des Aminosäure-Einbaus blieb über eine Dauer von ca. 60 Min. konstant. Dabei zeigte der Wildtypstamm nach 60 Min. eine Hemmung von 50% gegenüber dem Kontrollwert bei Zugabe von 30 - 50 µg/ml und eine fast vollständige Hemmung bei 1000 µg/ml. Die Mutante zeigte gegenüber dem Wildtyp eine wesentlich geringere Empfindlichkeit gegen Paromomycin. Eine Hemmung des Aminosäure-

Einbau um 50% wurde durch Zugabe von 1000 $\mu\text{g/ml}$ erreicht. Das entspricht der 2fachen Menge, die notwendig ist, den Einbau beim Wildtyp um 50% zu hemmen. (Abb. 5; Tab. 4)

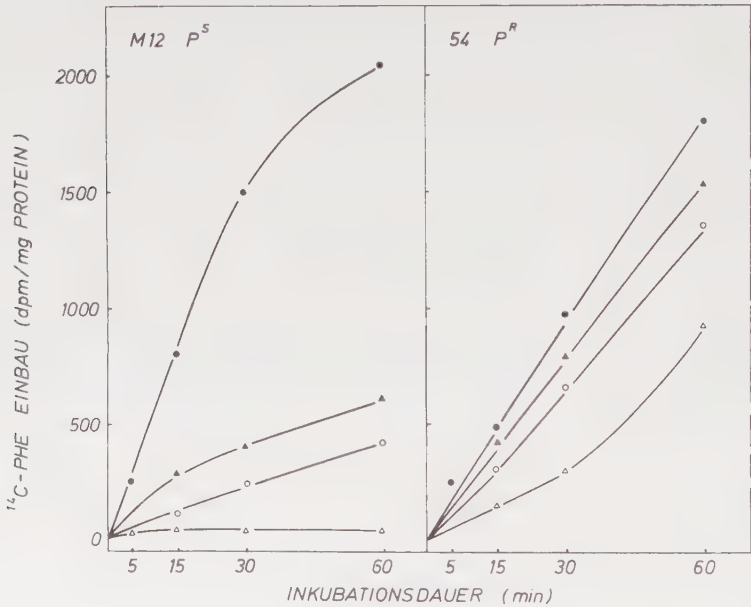


Abbildung 5: Wirkung von Paromomycin auf die Aktivität des mitochondrialen Aminosäure-Einbaus "in vitro". Mitochondrien der Stämme M12 P^S und 54 P^R wurden nach der Methode von Kovač isoliert und in Inkubationsmedium mit verschiedenen Paromomycin-Konzentrationen für eine Dauer von 60 Min. mit ¹⁴C-Phenylalanin bei 30°C inkubiert. (0,1 $\mu\text{Ci/ml}$) 1000 dpm entsprechen 1 pmol ¹⁴C-Phenylalanin. Paromomycin wurde in folgenden Konzentrationen zugegeben: ●—● 0 $\mu\text{g/ml}$; ▲—▲ 100 $\mu\text{g/ml}$; ○—○ 500 $\mu\text{g/ml}$; △—△ 1000 μg

Zugaben/ml	P-sensibel		P-resistent	
	dpm	%Hemmung	dpm	%Hemmung
-	2050	0	1800	0
CAP (50 µg)	200	90	220	88
AA (6 µg)	50	95	40	95
P (50 µg)	1000	50	1600	10
P (100 µg)	615	70	1530	15
P (500 µg)	410	80	1350	25
P (1000 µg)	20	95	920	50

Tabelle 4: "in vitro" **Hemmung** des mitochondrialen Aminosäure-Einbaus eines Paromomycin-sensiblen Stammes (M12) und der Paromomycin-resistenten Mutante 54 nach einer Inkubation von 60 Min.. Versuchsdurchführung wie bei Abb. 5 beschrieben wurde.

Da die Antibiotika-Resistenz auch "in vitro" erhalten bleibt, kann es sich bei den untersuchten Mutanten somit nicht um eine Permeabilitätsänderung der Zellmembran handeln. Die Veränderung, auf der die Resistenz beruht, muß daher in den Mitochondrien lokalisiert sein. Gegen das Vorliegen einer Permeabilitätsänderung spricht auch die Tatsache, daß die Sensibilität gegen andere Antibiotika und Hemmstoffe bei Mutante und Wildtyp gleich sind, sowie das

Auftreten von nur einer Kreuzresistenz (Neomycin).

Für die Aussagekraft der oben beschriebenen Experimente ist der eindeutige Nachweis dafür, daß der gemessene Aminosäure-Einbau tatsächlich in den Mitochondrien stattgefunden hat, unbedingt notwendig. Daher wurden verschiedene Kontrollen durchgeführt: Als Nachweis dafür, daß der Aminosäure-Einbau nicht auf einer Kontamination von Bakterien oder Hefezellen, die während der Präparation nicht zerstört worden waren, beruht, wurden Proben des Inkubationsgemischs auf YEP-Glukose- und Difco-Nutrient-Agar plattiert. Auf diesen Medien können eventuell vorhandene Bakterien und Hefezellen Kolonien bilden. Intakte Hefezellen wurden nicht beobachtet, die Verunreinigung der Mitochondrienpräparation durch Bakterien war gering, sie betrug höchstens 10^2 Zellen/ml. Versuche von Kroon et al. (1967) hatten gezeigt, daß bis zu 10^5 Bakterienzellen ohne signifikanten Einfluß auf die Einbauraten waren. Bakterielle und mitochondriale Proteinsynthese verhalten sich gegenüber Antibiotika sehr ähnlich. Daher ist bislang kein Antibiotikum bekannt, das eine direkte selektive Wirkung auf nur eines der beiden Proteinsynthesesysteme zeigt. Eine indirekte Unterscheidung von bakterieller und mitochondrialer Proteinsynthese läßt Antimycin A zu, ein Hemmstoff des mitochondrialen Elektronentransfers, der die mitochondriale Energiegewinnung im Gegensatz zur bakteriellen Energiegewinnung völlig blockiert. Von Chloramphenicol ist bekannt, daß es selektiv die mitochondriale Proteinsynthese hemmt und auf das cytoplasmatische System keine Wirkung zeigt.

Daher diente die Zugabe von Chloramphenicol zu einer Probe des Inkubationsgemischs zur Trennung zwischen mitochondrialer und cytoplasmatischer Proteinsynthese. Ferner erfolgte eine Behandlung der isolierten Mitochondrien mit RNase, wodurch eventuell noch vorhandene cytoplasmatische Ribosomen abgebaut werden. Mitochondriale Ribosomen werden dadurch nicht angegriffen, da RNase nicht in die Mitochondrien eindringen kann.

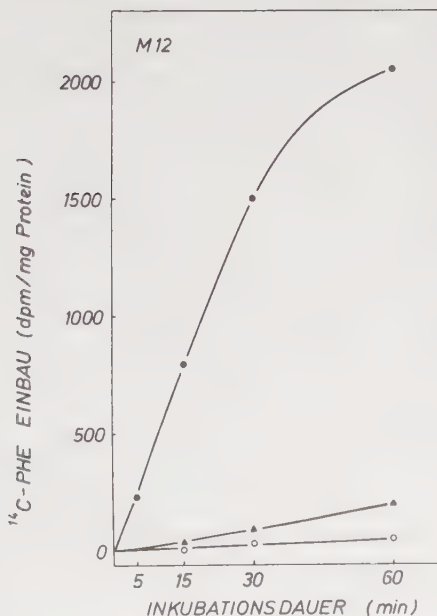


Abbildung 6: Kontrollexperiment für den Nachweis eines mitochondrialen Aminosäure-Einbaus. Versuchsdurchführung wie bei Abb.5. Zugaben: Chloramphenicol (50 µg/ml) ▲—▲ Antimycin A (6 µg/ml) ○—○ ; keine Zugabe ●—●

Der gemessene Aminosäure-Einbau erwies sich als sensibel gegen Antimycin A und gegen Chloramphenicol (Abb.6; Tab.4), jedoch insensibel gegen eine Behandlung der isolierten Mitochondrien mit RNase. Er beruht daher weder auf einer Verunreinigung durch Bakterien noch auf einer Kontamination von cytoplasmatischen Ribosomen. Diese Befunde dürfen als Nachweis dafür gelten, daß es sich tatsächlich um mitochondrialen Aminosäure-Einbau handelt.

Mitochondrien lassen sich in einem Saccharose-Dichte-Gradienten (70 - 20%) durch Zentrifugation bei 105,000 x g in einer Bande bei einer Dichte von 1,18 - 1,19 g/cm³ anreichern (Schatz 1964). Diese Bande ist auf Grund von Cytochromen bräunlich gefärbt. Ihre Fraktionen zeigen hohe Aktivität der Enzyme, die spezifisch für die Mitochondrien sind. Im vorliegenden Fall wurden Succinat-Cytochrom-c-Reductase und Malat-Dehydrogenase getestet (Abb.7). Succinat-Cytochrom-c-Reduktase ist in der Mitochondrienmembran lokalisiert, Malat-Dehydrogenase in der Matrix, daher dient sie gleichzeitig als Nachweis für die Unversehrtheit der Mitochondrien. Aufgeschlagene Mitochondrien verlieren die lösliche Matrix, sodaß nur geringe Malat-Dehydrogenaseaktivität nachweisbar ist. Handelt es sich bei dem gemessenen Aminosäure-Einbau tatsächlich um Proteinsynthese der isolierten Mitochondrien, so müßte bei der Dichte-Gradienten-Zentrifugation nach Inkubation mit ¹⁴C-Phenylalanin, eine Anreicherung der Radioaktivität in den gleichen Fraktionen auftreten, die auch die Mitochondrien enthalten.

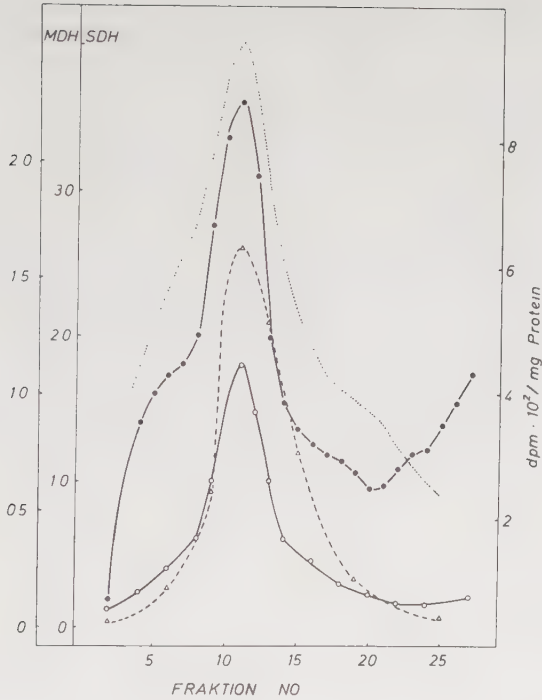


Abbildung 7: Verteilung der Radioaktivität ●—● (dpm/mg Protein, der Malat-Dehydrogenase, MDH Δ ---- Δ (E 340 nm/min·mg Protein), der Succinat-Cytochrom-c-Reduktase, SDH ○—○ (E 550 nm/min·mg Protein) und Extinktion bei 420 nm nach Gradienten-Zentrifugation der Mitochondrien im Anschluß an eine Inkubation von 60 Min. mit ^{14}C -Phenylalanin.

Aus Abb.7 geht hervor, daß alle drei Parameter: Dichte, Enzymaktivität und Radioaktivität in den gleichen Fraktionen ein Maximum aufweisen. Das zeigt also, daß nach Inkubation die Radioaktivität an die Mitochondrien gebunden auftritt, wodurch ein Nachweis erbracht ist, daß der Aminosäure-Einbau in den Mitochondrien stattgefunden hat.

Die Untersuchungen über die Wirkung des Antibiotikums Paromomycin auf den Aminosäure-Einbau isolierter Mitochondrien der Resistenz-Mutanten haben somit ergeben, daß die Paromomycin-Resistenz auch "in vitro" erhalten bleibt. Daher ist anzunehmen, daß der die Resistenz bedingende Faktor in den Mitochondrien lokalisiert ist.

DISKUSSION

Aminoglycoside Antibiotika wie Paromomycin und Neomycin hemmen die Proteinsynthese bei Bakterien dadurch, daß sie an die 30S Untereinheit des Ribosoms binden. Eine hemmende Wirkung dieser Antibiotika wird auch bei aerob wachsenden Hefezellen beobachtet. Jedoch lagen bisher unterschiedliche Meinungen darüber vor, in wie weit sich Aminoglycoside für mitochondriale Genetik eignen. Thomas und Wilkie (1968b) und Kleese et al. (1972) berichteten von Rekombinationsexperimenten mit Paromomycin-resistenten Mutanten, im Gegensatz dazu hielten Davey et al. (1970) Aminoglycoside nicht als geeignet für eine Unterscheidung zwischen mitochondrialer und cytoplasmatischer Proteinsynthese, da nur geringe Unterschiede für das Wachstum der Zellen in Antibiotika-Medium mit bzw. ohne vergärbbares Substrat auftraten. Auch in der vorliegenden Arbeit wurde festgestellt, daß die spezifische Hemmung der mitochondrialen Proteinsynthese durch Paromomycin und vor allem durch Neomycin nicht so signifikant ist wie z.B. durch Chloramphenicol oder Erythromycin. Jedoch auf Grund der Tatsache, daß eine vollständige Wachstumshemmung der Zellen des Wildtypstammes M12 in Glycerinmedium von einer nur geringen Hemmung in Glukosemedium begleitet war, wurde dieses System als geeignet für die Isolierung von Resistenz-Mutanten erachtet.

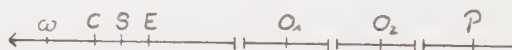
Die untersuchten Mutanten zeigten sich gegen Paromomycin-Konzentrationen bis zu 2 mg/ml resistent, während das Wachstum der Wildtypzellen bereits durch eine Konzentration von 0,1 mg/ml vollständig gehemmt wurde. Die vorliegenden Mutanten wiesen außer gegen Neomycin keine weitere Kreuzresistenz auf. Das Auftreten der mitotischen Segregation und die Ergebnisse der Tetradenanalyse charakterisierten sie als extrachromosomal. Der Verlust der Determinante für die Paromomycin-Resistenz durch petite-Induktion darf als Nachweis für den mitochondrialen Charakter der Mutation gelten.

Die "in vivo" beobachtete Paromomycin-Resistenz blieb bei den untersuchten Mutanten auch "in vitro" mit isolierten Mitochondrien erhalten. Dabei erwiesen sich Wildtypmitochondrien um den 20fachen Wert sensibler als isolierte Mitochondrien der Resistenz-Mutanten (50% Hemmung: 0,5 mg/ml vs. 1,0 mg/ml). Die hier aufgeführten Experimente lassen keine Aussage darüber zu, ob eine Veränderung der mitochondrialen Permeabilität oder der mitochondrialen Ribosomen vorliegt. Es kann lediglich ausgeschlossen werden, daß die Resistenz auf einer veränderten Permeabilität der Zellmembran beruht. Jedoch läßt das Auftreten von nur einer Kreuzresistenz gegen Neomycin, einem Antibiotikum, das von der Struktur her eng mit Paromomycin verwandt ist, auf eine sehr spezifische Veränderung schließen, die wahrscheinlich die Ribosomen betrifft. Grivell et al. (1971a) berichteten von einer Erythromycin-resistenten Mutante, bei der veränderte mitochondriale Ribosomen nachgewiesen wurden,

ohne jedoch Auskunft über die Art der Veränderung geben zu können. Die Arbeitsgruppe nahm an, daß auch hier in Analogie zu einer Resistenz-Mutante bei Bakterien (Tanaka et al. 1968) wahrscheinlich ein verändertes ribosomales Protein vorliege. Borst und Mitarbeiter konnten dagegen zeigen, daß auf der mitochondrialen DNS keine ribosomalen Proteine, sowohl der 5oS als auch der 3oS Untereinheit kodiert sind (Grivell et al. 1973) Somit kann ausgeschlossen werden, daß die Antibiotika-Resistenz durch die Veränderung eines ribosomalen Proteins bedingt wird; daher darf als Ursache für das Auftreten der Resistenz eine Veränderung der ribosomalen RNS angenommen werden.

Eine weitere Möglichkeit für die Art einer die Resistenz bedingende Veränderung in den Mitochondrien wird von Bunn et al. (1970) und Trembath et al. (1973) und Michel und Neupert (1973) diskutiert. Diese Arbeitsgruppen gehen von der Annahme aus, daß Mitochondrienmembran und mitochondriale Ribosomen eine funktionelle Einheit bilden. Eine Veränderung der mitochondrialen Membran würde daher dieselbe Wirkung haben wie die Veränderung der mitochondrialen Ribosomen, da in beiden Fällen die funktionelle Einheit verändert ist. Somit könnte eine Antibiotika-Resistenz "in vitro" sowohl durch eine Veränderung der Ribosomen, als auch durch eine Veränderung der funktionellen Einheit zwischen Membran und Ribosomen bedingt sein.

Inzwischen konnte die Paromomycin-resistente Mutante 54 kartiert werden (Wolf et al. 1973). Dazu wurden homo- und heterosexuelle drei- und vier-Faktorkreuzungen mit allen möglichen cis-trans Konfigurationen der mitochondrialen Marker für Chloramphenicol-, Erythromycin-, Oligomycin- und Paromomycin-Resistenz durchgeführt. (Im Folgenden werden diese Marker mit C, E, O, P bezeichnet.) Dabei erwies sich P als weder gekoppelt mit C und E, noch mit O. Aus diesen Kreuzungen ging ferner hervor, daß bei Markern wie O und P, welche weiter entfernt von w liegen, die für heterosexuelle Kreuzungen typische Polarität nicht auftritt. Daher ist es nicht möglich, die relative Lage von O und P in bezug auf w festzulegen. Grundsätzlich kann ausgesagt werden, daß die Entfernung C - E kleiner ist als die Entfernung C - O und C - P. Daraus und aus weiteren unveröffentlichten Ergebnissen (Wolf, persönliche Mitteilungen) ergibt sich bisher folgende Genkarte für die mit-DNS:



Somit konnte mit Hilfe der untersuchten Paromomycin-resistenten Mutanten ein neuer Bereich der mit-DNS kartiert werden. Die anderen Paromomycin-resistenten Mutanten erwiesen sich in Rekombinationsexperimenten als identisch; sie betreffen also alle den gleichen Genort und können daher nicht zur weiteren Kartierung herangezogen werden. Um eine genauere Aussage über die Lage von P machen zu können,

müßten weitere Mutanten isoliert werden, deren Veränderung auch im Bereich der P-Region kodiert ist und daher eine Koppelung mit dem P-Marker aufweist. Das könnte vielleicht für die in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Neomycin-resistenten Mutanten der Fall sein, da es sich hierbei um eine Resistenz gegen ein Antibiotikum handelt, das ebenso wie Paromomycin an die kleine Untereinheit des Ribosoms bindet. Von den bisher kartierten Resistenzen, (Chloramphenicol, Spiramycin, Erythromycin) welche Antibiotika betreffen, die an der großen Untereinheit des Ribosoms angreifen, ist bekannt, daß die die Resistenzen bedingenden Informationen auf der mit-DNS gekoppelt angeordnet sind. In Analogie dazu kann man vermuten, daß auch die Resistenzen gegen Neomycin und Paromomycin durch Veränderungen der Information in der gleichen Region hervorgerufen werden.

Während als gesichert anzunehmen ist, daß die mit-DNS zumindest zeitweise ringförmig auftritt (Hollenberg et al. 1969), gibt es bisher keine experimentellen Daten, die eine ringförmige Kopplungsgruppe erkennen lassen. Falls ein ringförmiges Genom vorliegt, ist zu schließen, daß der Abstand $P - \omega - C$ so groß ist, daß P und C ungekoppelt erscheinen. Ähnliche Ergebnisse wurden ja auch in den Anfängen der Phagen-Genetik für die DNS der T2 Phagen erhalten (Hershey 1953). Demnach sind weitere Untersuchungen zu dieser Problematik erst sinnvoll, wenn Marker zur Verfügung stehen, welche die Genkarte über den Marker P hinaus erweitern. In diesem Zusammenhang erscheint die

Kartierung der in dieser Arbeit beschriebenen Neomycin-resistenten Mutanten lohnend. Ähnlich den Resistenzen gegen Hemmstoffe, die an der 5oS Untereinheit angreifen, könnten auch Aminoglycoside einen größeren gekoppelten Bereich des mitochondrialen Genoms markieren.

M A T E R I A L U N D M E T H O D E N

1) Hefestämme (*Saccharomyces cerevisiae*)

M12	<u>a</u>	ile5, trp2, ura3	(Kakar)
1761	<u>α</u>	his4, trp1, trp5, ade2,1; leu2,1; lys1,1; tyr a-6-1; gal1	(Seattle stock)
1625C ₁	<u>α</u>	ade3, ura	(Seattle stock)
3o IIIf	<u>α</u>	ura, leu	

2) Medien

<u>YEP-Glukose:</u>	Hefeextrakt	10 g
	Universalpepton	10 g
	Agar (Difco)	15 g
	Glukose	30 g
	H ₂ O dest.	ad 1 Ltr.
	Glukose wurde nach dem Autoklavieren steril zugegeben.	

YEP-Glyzerin: wie zuvor, statt Glukose 30 ml Glyzerin.

<u>Minimalagar:</u>	Difco Yeast Nitrogen Base	7 g
	Agar	15 g
	Glukose	40 g
	H ₂ O dest.	ad. 1 Ltr.
	Einzelne Aminosäuren wurden nach Bedarf sublementiert.	

Acetat - Agar zur Sporulation:

Na-Acetat	4 g
Agar	15 g
H ₂ O dest.	ad 1 Ltr.

Paromomycin-Medium:

YEP-Glyzerinmedium

Phosphatpuffer 50 mM pH 6,5

Paromomycin 2 mg/ml Medium

Neomycin-Medium: wie zuvor, statt Paromomycin 4 mg
Neomycin/ml.

Hefeextraktmedium für Flüssigkulturen:

I) Stammlösungen

a) Salze:	(NH ₄) ₂ SO ₄	500 g
	KH ₂ PO ₄	437 g
	K ₂ HPO ₄	62,5 g
	MgSO ₄ • 7 H ₂ O	250 g
	NaCl	50 g
	H ₂ O dest.	ad. 2 Ltr.

b) Spurenelemente: (getrennt ansetzen)

H ₃ BO ₄	0,1 %
CuSO ₄ • 5 H ₂ O	0,1 %
KJ	0,1 %
FeCl ₃ • 6 H ₂ O	0,5 %
ZnSO ₄ • 7 H ₂ O	0,7 %

c) Vitaminlösung:

Thiamin-Hydrochlorid	400 mg
Biotin	2 mg

Inositol	2 mg
Pyridoxin-Hydrochlorid	400 mg
Ca-Pantothenat	400 mg
Riboflavin	400 mg
H ₂ O dest.	1 Ltr.

d) CaCl₂-Lösung:

CaCl ₂ • H ₂ O	100 g
H ₂ O	ad. 1 Ltr.

Für das Hefeextraktmedium nach Wickerham werden diese Stammlösungen in folgendem Verhältnis zusammengegeben:

Salzlösung a/b)	1000 ml
Vitaminlösung c)	50 ml
CaCl ₂ -Lösung d)	50 ml
H ₂ O	ad. 5 Ltr.

Das Medium wird sterilisiert und bei Bedarf mit Wasser 1 : 10 verdünnt und mit der gewünschten Kohlenstoffquelle versetzt.

Inkubationsmedium für Markierungsversuche:

Mannit	0,6 M
KCl	100 mM
Tris-HCl	33 mM
MgCl ₂	10 mM
KH ₂ PO ₄	10 mM
α-Ketoglutarat	3 mM
Malat	3 mM
Pyruvat	3 mM

Das Medium wird mit Tris auf pH 6,7 eingestellt und filtersterilisiert, ADP (2mM) wird separat angesetzt und kurz vor Gebrauch dem Inkubationsmedium zugefügt.

Inkubationsgemisch für petite-Induktion mit Ethidiumbromid

Ethidiumbromid	10 µg/ml
Cycloheximid	10 µg/ml
Phosphatpuffer	0,05 M, pH 6,5
Hefezellen	10 ⁶ /ml

Puffer:

<u>Phosphatpuffer:</u>	pH 6,5	
KH ₂ PO ₄		1 M (87,9%)
NaHPO ₄		1 M (12,1%)

<u>Tris-HCl-Puffer:</u>	pH 8.0	50 mM
+ Cysteamin		50 mM

<u>Sorbitolpuffer:</u>	pH 5,7	
Tris		20 mM
Maleat		20 mM
EDTA		2 mM
Sorbitol		1,3 mM

<u>Mannitolpuffer:</u>	pH 6,5	
Mannit		12 %
Maleat		20 mM
Tris		20 mM
EDTA		2 mM
BSA		0,05 %

Phosphorylierungspuffer:

pH 6,5

Mannitol	109,2 g
KH_2PO_4	1,52 g
K_2HPO_4	1,52 g
K_3PO_4	1,54 g
Tris	1,21 g
Maleinsäure	1,16 g
BSA	500 mg
H_2O	ad. 1 Ltr.

Saccharose-Lösung für Gradienten:

pH 7,4

Tris	10^{-2} M
EDTA	10^{-3} M

In diesem Puffer wird Saccharose zu 70% und 20% (Gewicht/Volumen) gelöst.

Chemikalien:

Alle verwendeten Chemikalien wurden von der Firma Merck, Darmstadt bezogen, mit Ausnahme von:

Paromomycin: Parke, Davis & Co., München

Neomycin: Boehringer, Mannheim

Antimycin A: Serva GmbH, Heidelberg

Chloramphenicol: Bayer, Leverkusen

Cycloheximid: Serva GmbH, Heidelberg

Helicase: Boehringer, Mannheim

Radioaktive Aminosäuren: Radiochemical Centre, Amersham

Ethidiumbromid: Serva GmbH, Heidelberg

Cytochrom c: Boehringer, Mannheim

Scintillator: Packard GmbH, Frankfurt

3) Methoden

Wachstumskurven:

Flüssigkulturen (jeweils 2 ml) mit verschiedenen Antibiotika-Konzentrationen und einem Ausgangstiter von ca. 10^6 Zellen/ml wurden bei 30°C geschüttelt. Zu verschiedenen Zeiten wurde durch Messung der Extinktion bei 578 nm der Titer bestimmt. (Photometer Eppendorf, Fa. Netheler und Hinz)

Isolierung der Mutanten:

Zellen des Paromomycin-sensiblen Stammes M12 wurden in Flüssigmedium mit der Kohlenstoffquelle Glycerin bis zur stationären Phase gezüchtet und auf Paromomycin-Agar (1mg/ml) plattiert. (ca. 10^7 Zellen pro Platte) Nach Bebrütung von 4 - 5 Tagen wurden pro Platte durchschnittlich fünf spontan entstandene resistente Kolonien sichtbar. Diese wurden abisoliert und nach einem weiteren Reinigungsschritt solche Mutanten ausgesucht, die sich auch gegen 2 mg Paromomycin/ml resistent erwiesen.

Mitotische Segregation:

Zur Bildung diploider Zellen wurden jeweils ca. 5 ml Flüssigkultur mit Glycerin eines resistenten (a) und eines sensiblen (α) Stammes mit mindestens einer Auxotrophie gezüchtet und in der logarithmischen Phase zusammengegeben. Dieses Gemisch wurde 15 Std. ohne Belüftung weiter gezüchtet, abzentrifugiert und in etwa 1 ml Wasser aufgenommen. Zur Selektion diploider Zellen wurde die Suspension auf Minimal-

agar mit entsprechenden Sublementierungen plattiert. Nach Bebrütung von 3 Tagen wurden die diploiden Kolonien abgewaschen und nach entsprechender Verdünnung ca. 50 Zellen pro Minimalmediumplatte verteilt. Die nach 3 Tagen gewachsenen Kolonien wurden zur Unterscheidung von Paromomycin-resistenten, bzw. -sensiblen Diploiden auf selektive Medien abgestempelt.

Petite - Induktion mit Ethidiumbromid:

Die Inkubation erfolgte unter nicht-wachsenden Bedingungen in dem im Abschnitt "Material" beschriebenen, Inkubationsgemisch mit Paromomycin-resistenten Zellen. Nachdem das Inkubationsgemisch für 15 Std. bei 30°C geschüttelt worden war, wurde es entsprechend verdünnt und auf Glukoseagar plattiert und die nach 3 Tagen entstandenen Kolonien auf YEP-Glyzerinagar abgestempelt, um atmungsdefekte Kolonien zu selektieren. Diese wurden wiederum auf YEP-Glyzerinagar ausgestrichen und durch Abstempeln auf Minimalagar, auf den ein Rasen atmungskompetenter, Paromomycin-sensibler Zellen plattiert worden war, diploidisiert. Die so entstandenen Diploiden wurden auf Paromomycin-Resistenz und Atmungskompetenz getestet.

Tetradenanalyse:

Zur Tetradenanalyse wurden diploide Zellen (Gewinnung wie im Abschnitt "Mitotische Segregation") in Flüssigmedium suspendiert ($2 - 5 \times 10^6$ Zellen/ml) und nach etwa 15 Std. Wachstum ohne Belüftung abzentrifugiert. Anschließend wurde

das Pellet in 0,3 ml Wasser aufgenommen und das ganze Gemisch auf Acetatagar gegeben. Nach Bebrütung (30°C) von 4 - 5 Tagen bildeten sich Asci mit Sporen. Um die Tetraden zu analysieren, wurden die Zellen von dem Acetatagar abgeschabt, in 2 ml Wasser suspendiert und für eine Dauer von ca. 20 Min. mit 20 - 30 µl Helicase behandelt, um die Ascuswände anzudauen. Danach wurden die Zellen abzentrifugiert, einmal gewaschen und in 0,3 - 1,0 ml Wasser aufgenommen. Von dieser Suspension wurde jeweils ein Tropfen auf Glukoseagar ausgetropft und ausgestrichen. Die vier Sporen eines Ascus wurden mit Hilfe eines Mikromanipulators von der Ascushülle befreit und auf der Agarplatte verteilt. Nach Bebrütung von 4 - 5 Tagen bei 30°C erfolgte das Abstem-peln der, aus den Ascosporen, herangewachsenen Kolonien auf selektive Medien.

Mitochondriengewinnung: (Kovač 1972)

Zellen wurden in Flüssigmedium (5 l) mit 2% Galaktose gezüchtet, in der exponentiellen Wachstumsphase ($1 - 2 \times 10^7$ Zellen/ml) geerntet und einmal mit Wasser gewaschen. (Sorvall-Zentrifuge RC2-B, Rotor GS-3) Als Vorbereitung für die Protoplastengewinnung wurden die Zellen (8 - 10 g Naßgewicht) in 20 ml Tris-HCl-Puffer + Cysteamin suspendiert und 30 Min. bei 30°C geschüttelt. Nach Zentrifugation bei 2000 x g für 5 Min. (Rotor SS-34) wurde das Pellet in 20 ml Sorbitol-puffer aufgenommen, 1 ml Helicase zupipetiert und nochmals bei 30°C geschüttelt (30 - 60 Min.). Nach jeweils 15 Min. erfolgte eine Kontrolle der Protoplastenbildung, indem eine

Probe des Inkubationsgemischs in Manitolpuffer gegeben und unter dem Mikroskop betrachtet wurde. Betrug der Anteil der Protoplasten ca. 50%, wurde die Inkubation durch Abzentrifugieren gestoppt. (3000 x g, 0°C, 10 Min.) Das entstandene Pellet wurde zweimal in eiskaltem Sorbitolpuffer gewaschen, anschließend in 80 ml Mannitolpuffer suspendiert und 3 - 4 mal leicht gepottert. Aus diesem Gemisch ließen sich durch drei differentielle Zentrifugationen die Mitochondrien gewinnen. Durch Zentrifugation bei 1000 x g (10 Min.) und 1450 x g (15 Min.) wurden ganze Zellen und größere Fragmente abgetrennt. Das Pellet einer Zentrifugation bei 30.000 x g (20 Min.) enthält hauptsächlich Mitochondrien und Mitochondrienfragmente. Diese wurden direkt für radioaktive Markierungsversuche verwendet.

Einbau von radioaktiven Aminosäuren in isolierten Mitochondrien:

Hierzu wurde eine Methode von Grivell (1967) mit geringfügigen Änderungen angewandt.

Mitochondrien wurden entsprechend den oben beschriebenen Angaben gewonnen, sofort in Inkubationsgemisch suspendiert, leicht gepottert und auf mehrere Reagenzgläser verteilt. Den einzelnen Proben wurden entweder verschiedene Paromomycinmengen (0, 50, 100, 500, 1000 µg/ml) oder Chloramphenicol (50 µg/ml) zur Hemmung der mitochondrialen Proteinsynthese oder Antimycin A (6 µg/ml) als Kontaminationskontrolle für Bakterien zugesetzt. Das Inkubationsgemisch enthielt mitochondriale Proteine in einer Konzentration

von 0,2 - 1,4 mg/ml. Während der Inkubation wurden die Proben (1,0 - 2,5 ml) bei 30°C mit einer Frequenz von 130/Min. geschüttelt. Nach einer Vorinkubation von 5 Min. erfolgte die Zugabe von ^{14}C - Phenylalanin. Im Laufe der Inkubation wurden nach jeweils 5, 15, 30, 60 Min. Proben von 0,4 ml entnommen und zum Abstoppen der Reaktion in 5% Trichlor-essigsäure pipettiert.

Kontaminationskontrollen:

Alle Kulturen wurden mikroskopisch auf das Vorhandensein von Bakterien oder Hefezellen einer anderen Art als Saccharomyces cerevisiae geprüft. Außerdem wurde eine Probe des Inkubationsgemischs mit isolierten Mitochondrien auf YEP-Glukoseagar plattiert, um sicher zu sein, daß der Einbau nicht auf Grund der Anwesenheit von intakten Hefezellen stattfindet. Ferner wurde eine Probe auf Glukoseagar, dem 10 µg CHX/ml zugesetzt wurde, plattiert. Auf diesem Medium sind nur Bakterien in der Lage Kolonien zu bilden. Dem gleichen Zweck diene auch die Zugabe von Antimycin A, das spezifisch den mitochondrialen Elektronentransfer hemmt, zu einer Probe des Inkubationsgemisches.

Gradientenzentrifugation:

Lineare Gradienten (38 ml) zwischen 70% und 20% Saccharose wurden mit Hilfe eines Mischers hergestellt. Das 30,000 x g Pellet wurde in 1 - 2 ml Mannitolpuffer aufgenommen, in einem Glas-Teflon-Potter gut homogenisiert und vor-

sichtig auf die bei 2°C vorgekühlten Gradienten geschichtet. Die präparative Zentrifugation erfolgte in einem SW27 Rotor bei 27,000 Upm (mittlere Zentrifugalkraft 95,000 x g) über eine Dauer von 90 Min. bei 3°C. (Ultrazentrifuge: L2 50B Beckmann Instruments)

Zur Fraktionierung der Gradienten wurden die Becher von unten angestochen, der Inhalt über eine Injektionsnadel abgesaugt und durch eine Durchflußküvette im Photometer geleitet. (DB Beckmann Instruments) Gleichzeitig wurde die Extinktion bei 420 nm von einem Schreiber aufgezeichnet und anschließend Fraktionen von jeweils 20 Tropfen aufgefangen. (Ultrac-Rac-Fraktionssammler Fa. LKB) Diese Fraktionen wurden bis zur Weiterverarbeitung bei -20°C aufbewahrt.

Bestimmungsmethoden:

a) Radioaktivitätsbestimmung

Die Mitochondrienproteine der Proben, die während der Inkubation entnommen worden waren, wurden in Nethelerbechern mit 5% Trichloressigsäure (TCA) ausgefällt, abzentrifugiert und das Pellet mehrmals in TCA 6% gewaschen. (Mikrozentrifuge 3200 Eppendorf, Fa. Nehteler und Hinz) Anschließend wurden die Proben für 10 Min. auf 90 - 95°C erhitzt, dann zweimal in einem Gemisch aus Äthanol und Äther (3 : 1) und nochmals in reinem Äther gewaschen. Die an der Luft getrockneten Proben wurden jeweils in 0,5 ml Soluene gelöst (24 Std.) und dann in 10 ml Scintillations-

flüssigkeit (Toluol + PPO + Dimethyl-POPOP) gegeben. Die Radioaktivitätsmessung erfolgte im Scintillationszähler (Modell 3003, fa. Packard).

- b) Protein wurde nach der Methode von Lowry et al. (1951) bestimmt (Photometer PMQ der Fa. Zeiss).
- c) Die Dichte des Zuckers wurde mit einem Abbe-Refraktometer (Fa. Zeiss) bestimmt.
- d) Die Succinat-Cytochrom-c-Reduktase wurde nach einer Methode von Arrigoni et al. (1962) bestimmt.
- e) Die Bestimmung der Malat-Dehydrogenase-Aktivität erfolgte nach einer Methode von Ochoa (1955).

L I T E R A T U R V E R Z E I C H N I S

- Apirion, D.: Three genes that affect *Escherichia coli* ribosomes.
J. Mol. Biol. 30, 255 - 275 (1967)
- Arrigoni, O. and Singer, Th. P.: Limitations of the phenazine methosulfate assay for succinic and related dehydrogenases.
Nature 193, 1256 - 1265 (1962)
- Avner, P.R. and Griffith, D.E.: Oligomycin resistant mutants in yeast.
FEBS Letters 10, 202 - 206 (1970)
- Avner, P.R.; Coen, D.; Dujon, B.; Slonimski, P.P.: Mitochondrial Genetics: IV. Allelism and mapping studies of oligomycin resistant mutants in *Saccharomyces cerevisiae*.
Molec. gen. Genet. 125, 9 - 52 (1973)
- Bauer, W. and Vinograd, J.: The interaction of closed circular DNA with intercalative dyes.
J. Mol. Biol. 33, 141 - 171 (1968)
- Bolotin, M.; Coen, D.; Deutsch, J.; Dujon, B.; Netter, P.; Petrochilo, E.; Slonimski, P.P.: La recombinaison des mitochondries chez *Saccharomyces cerevisiae*.
Bull. Institut Pasteur 69, 215 - 239 (1971)
- Bunn, C.L.; Lukins, H.B.; Linnane, A.W.: Biogenesis of Mitochondria XVIII: A new class of cytoplasmically determined antibiotic-resistant mutants in *Saccharomyces cerevisiae*.
Proc. Natl. Acad. Sci. U S A 67, 1233 - 1240 (1970)

- Clark-Walker, G.D. and Linnane, A.W.: "in vivo" differentiation of yeast cytoplasmic and mitochondrial protein synthesis with antibiotics.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 25, 8 - 13 (1966)
- Coen, D.; Deutsch, J.; Netter, P.; Petrochilo, E.; Slonimski, P.P.: In: Control of organelle development.
Cambridge: University Press (1970) p. 449 - 496
- Davey, P.J.; Haslam, J.M.; Linnane, A.W.: Biogenesis of Mitochondria XII: The effects of aminoglycoside antibiotics on the mitochondrial and cytoplasmic protein-synthesizing systems of *Saccharomyces cerevisiae*.
Arch. Biochem. Biophys. 136, 54 - 64 (1970)
- Davies, J.; Gilbert, W.; Gorini, L.: Streptomycin, suppression, and the code.
Proc. Natl. Acad. Sci. U S A 51, 883 - 890 (1964)
- Ephrussi, B.: Cytoplasmic heredity in yeasts. In: Nucleo-cytoplasmic relation in micro-organisms. p. 13 - 50
Clarendon Press, Oxford, England (1953)
- Estabrook, R.A.: Mitochondrial respiratory control and the polarographic measurement of ADP : O ratios.
Meth. Enzymol. 10, 41 - 47 (1967)
- Goldring, E.S.; Grossman, L.J.; Krupnick, D.; Cryer, D.R.; Marmur, J.: Loss of mitochondrial DNA during induction of "petites" with ethidium bromide.
J. Mol. Biol. 52, 323 - 335 (1970)
- Gorini, L.; Rosset, R.; Zimmermann, H.A.: Phenotypic masking and streptomycin dependence.
Science 157, 1314 - 1317 (1967)

Grivell, L.A.: Amino acid incorporation by mitochondria isolated, essentially free of micro-organisms, from *Saccharomyces cerevisiae*.

Biochem. J. 105, 44c - 46c (1967)

Grivell, L.A.; Reijnders, L.; DeVries, H.: Altered mitochondrial ribosomes in a cytoplasmic mutant of yeast.

FEBS Letters 16, 159 - 163 (1971a)

Grivell, L.A.; Reijnders, L.; Borst, P.: Isolation of yeast mitochondrial ribosomes highly active in protein synthesis.

Biochim. Biophys. Acta 247, 91 - 103 (1971b)

Grivell, L.A.; Netter, P.; Borst, P.; Slonimski, P.P.:

Mitochondrial antibiotic resistance in yeast: Ribosomal mutations resistant to chloramphenicol, erythromycin, and spiramycin.

Hershey, A.D.: Inheritance in bacteriophage.

Advances in Genetics V, 89 - 106 (1953)

Hollenberg, C.P.; Borst, P.; Thuring, R.W.J.; van Bruggen, E.F.J.: Size, structure, and genetic complexity of yeast mitochondrial DNA.

Biochim. Biophys. Acta 186, 417 - 419 (1969)

Kaij, H. and Tanaka, Y.: Bindings of dihydrostreptomycin to ribosomal subunits.

J. Mol. Biol. 32, 221 - 230 (1968)

Kleese, R.A.; Grotbeck, R.C.; Snyder, J.R.: Rekombination among three mitochondrial genes in yeast.

J. Bact. 112, 1023 - 1025 (1972)

- Kovac, L.; Groot, G.S.P.; Racker, E.: Translocation of protons and potassium ions across the mitochondrial membrane of respiring and respiration-deficient yeasts. *Biochim. Biophys. Acta* 256, 55 - 65 (1972)
- Krembel, J. and Apirion, D.: Changes in ribosomal proteins associated with mutants in a locus that affects *Escherichia coli* ribosomes. *J. Mol. Biol.* 33, 363 - 368 (1968)
- Kroon, A.M.: Protein synthesis in heart mitochondria I. Amino acid incorporation into protein of isolated beef-heart mitochondria and fractions derived from them by sonic oscillation. *Biochim. Biophys. Acta* 72, 391 - 402 (1963)
- Kroon, A.M.; Saccone, C.; Botman, M.J.: RNA and protein synthesis by sterile rat-liver mitochondria. *Biochim. Biophys. Acta* 142, 552 - 554 (1967)
- Küntzel, H.: Proteins of mitochondrial and cytoplasmic ribosomes from *Neurospora crassa*. *Nature* 222, 142 - 146 (1969)
- Lamb, A. J.; Clark-Walker, G.D.; Linnane, A.W.: Biogenesis of Mitochondria IV: The differentiation of mitochondrial and cytoplasmic protein synthesizing systems "in vitro" by antibiotics. *Biochim. Biophys. Acta* 161, 415 - 427 (1968)
- LePecq, J.B. and Paoletti, C.: A fluorescent complex between ethidium bromide and nucleic acids. *J. Mol. Biol.* 27, 87 - 106 (1967)

- Linnane, A.W.; Saunders, G.W.; Gingold, E.B.; Lukins, H.B.:
Biogenesis of Mitochondria V: Cytoplasmic inheritance
of erythromycin resistance in *Saccharomyces cerevisiae*.
Proc. Natl. Acad. Sci. U S A 59, 903 - 910 (1968b)
- Linnane, A.W.; Lamb, A.J.; Christodolou, C.; Lukins, H.B.:
Biogenesis of Mitochondria VI: Biochemical basis of the
resistance of *Saccharomyces cerevisiae* towards antibiotics
which specifically inhibit mitochondrial synthesis.
Proc. Natl. Acad. Sci. U S A 59, 1288 - 1293 (1968a)
- Lowry, O.H.; Rosenbrough, N.J.; Farr, A.L.; Randall, R.J.:
Protein measurement with the folin phenol reagent.
J. Biol. Chem. 193, 265 - 275 (1951)
- McLean, J.R.; Cohn, G.L.; Brandt, I.K.; Simpson, M.V.:
Incorporation of labeled amino acids into the protein
of muscle and liver mitochondria.
J. Biol. Chem. 233, 657 - 663 (1958)
- Michel, R. and Neupert, W.: Mitochondrial translation
products before and after integration into the mitochon-
drial membrane in *Neurospora crassa*.
Eur. J. Biochem. 36, 53 - 67 (1973)
- Monolou, J.C.; Jakob, H.; Slonimski, P.P.: Mitochondrial
DNA from "petite-mutants": specific changes of buoyant
density corresponding to different cytoplasmic mutations.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 24, 218 - 224 (1966)
- Ochoa, S.: In: Methods in Enzymology I (Colowick, S.P.;
Kaplan, N.O.) p. 735 - 739
Academic Press, New York (1955)

Pestka, S.: Inhibitors of ribosome function.

Annual Review of Microbiology 25, 487 - 562 (1971)

Piko, L.; Blair, D.G.; Tyler, A.; Vinograd, J.: Cytoplasmic DNA in the unfertilized sea-urchin egg: Physical properties of circular mitochondrial DNA and the occurrence of catenated forms.

Proc. Natl. Acad. Sci. U S A 59, 838 - 845 (1968)

Reis, P.J.; Roodyn, D.B.; Work, T.S.: Protein synthesis in mitochondria: Requirements for the incorporation of radioactive amino acids into mitochondrial protein. Biochem. J. 80, 9 - 21 (1961)

Roodyn, D.B.; Suttie, J.W.; Work, T.S.: Protein synthesis in mitochondria: Rate of incorporation "in vitro" of radioactive amino acids into soluble proteins in the mitochondrial fraction, including catalase, malic-dehydrogenase, and cytochrome c. Biochem. J. 83, 29 - 40 (1962)

Schatz, G.: Biogenesis of Mitochondria. In: Membranes of mitochondria and chloroplasts. (E. Racker) p. 251 - 314 Van Nostrand Reinhold Company, New York (1970)

Schlessinger, D.: Ribosomes: Development of some current ideas. Bact. Rev. 33, 445 - 453 (1969)

Schweyen, R.J. and Kaudewitz, F.: Differentiation between mitochondrial and cytoplasmic protein synthesis "in vivo" by use of a temperature - sensitive mutant of *Saccharomyces cerevisiae*. Biochem. Biophys. Res. Commun. 44, 1351 - 1355 (1971)

- Sebald, W.; Hofstötter, Th.; Hacker, D.; Bücher, Th.:
Incorporation of amino acids into protein of flight
muscle of *Locusta migratoria* "in vitro" and "in vivo"
in the presence of cycloheximide.
FEBS Letters 2, 177 - 180 (1969)
- Sherman, F.: Respiration-deficient mutants of yeast.
I Genetics.
Genetics 48, 375 - 385 (1963)
- Siegel, M.R. and Sisler, H.D.: Cycloheximide and other
glutarimide antibiotics. In: Antibiotics, mechanism
of action. (Gottlieb, D.; Shaw, P.D.)
Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York (1967)
- Slonimski, P.P.; Perrodin, G.; Croft, J.H.: Ethidium bro-
mide induced mutation of yeast mitochondria: complete
transformation of cells into respiratory-deficient
non-chromosomal "petites".
Biochem. Biophys. Res. Commun. 30, 232 - 239 (1968)
- Stuart, K.D.: Cytoplasmic inheritance of oligomycin and
rutamycin resistance in yeast.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 39, 1045 - 1051 (1970)
- Tanaka, K.; Teraoka, H.; Tamaki, M.: Erythromycin-resistant
mutant of *Escherichia coli* with altered ribosomal pro-
tein component.
Science 162, 576 - 578 (1968)
- Thomas, D.Y. and Wilkie, D.: Inhibition of mitochondrial
synthesis in yeast by erythromycin: cytoplasmic and
nuclear factors controlling resistance.
Genet. Res. Camb. 11, 33 - 40 (1968a)

- Thomas, D.Y. and Wilkie, D.: Rekombination of mitochondrial drug-resistance factors in *Saccharomyces cerevisiae*.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 30, 368 - 372 (1968b)
- Trembath, M.K.; Bunn, C.L.; Lukins, H.B.; Linnane, A.W.:
Biogenesis of Mitochondria 27: Genetic and biochemical characterization of cytoplasmic and nuclear mutations to spiramycin-resistance in *Saccharomyces cerevisiae*.
Molec. gen. Genet. 121, 35 - 48 (1973)
- Wakabayashi, K. and Gunge, N.: Extrachromosomal inheritance of oligomycin resistance in yeast.
FEBS Letters 6, 302 - 304 (1970)
- Waring, M.J.: Complex formation with DNA and inhibition of *Escherichia coli* RNA-polymerase by ethidium bromide.
Biochim. Biophys. Acta 87, 358 - 361 (1964)
- Weisblum, B. and Davies, J.: Antibiotic inhibitors of bacterial ribosomes.
Bact. Rev. 32, 493 - 528 (1968)
- Wilkie, D.: Analysis of mitochondrial drug-resistance in *Saccharomyces cerevisiae*.
In: Symposium Soc. Exptl. Biol. XXIV. London
Cambridge University Press (1970)
- Wintersberger, E.: Proteinsynthese in isolierten Mitochondrien.
Biochem. Z. 341, 409 - 419 (1965)
- Wolf, K.; Dujon, B.; Slonimski, P.P.: Mitochondrial Genetics V: Multifactorial mitochondrial crosses involving a mutation conferring paromomycin-resistance in *Saccharomyces cerevisiae*.
Molec. gen. Genet. 125, 53 - 90 (1973)

Z U S A M M E N F A S S U N G

1. Von Saccharomyces cerevisiae wurden Mutanten isoliert, die sich gegen 2 mg Paromomycin/ml resistent verhielten. (Paromomycin ist ein Aminoglycosid, das an die 30S Untereinheit bakterieller Ribosomen bindet.) Alle zeigten Kreuzresistenz gegen Neomycin.
2. Zur genetischen Charakterisierung wurden die Mutanten nach drei verschiedenen Kriterien untersucht:
 - a) das Auftreten der mitotischen Segregation
 - b) das Auftreten bzw. Fehlen der Resistenz nach Zerstörung der mit-DNS
 - c) das Aufspalten der Resistenz in der Tetradenanalyse nach der MeioseDie Untersuchungsergebnisse erwiesen die Paromomycin-resistenten Mutanten als extrakaryotisch und mitochondrial.
3. Der Aminosäure-Einbau in isolierten Mitochondrien der Paromomycin-resistenten Mutanten war ebenfalls resistent gegen das Antibiotikum. Die Resistenz dieser Mutanten beruht daher nicht auf einer Veränderung der Zellmembran, sondern ist durch eine Veränderung der Mitochondrien bedingt.
4. Ferner wurden Neomycin-resistente, Paromomycin-sensible Mutanten isoliert. Beide Resistenzen müssen somit nicht immer gemeinsam auftreten. Die diese Resistenzen bedingenden Veränderungen des mitochondrialen Genoms sind daher nicht notwendigerweise identisch.

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Januar 1971 bis Februar 1974 am Institut für Genetik der Universität München unter der Anleitung von Prof. Dr. F. Kaudewitz durchgeführt.

Herrn Prof. Dr. F. Kaudewitz möchte ich für sein Interesse und gute Arbeitsbedingungen, Herrn Dr. R.J. Schweyen für seine Hilfsbereitschaft und anregende Diskussionen danken.

LEBENS LAUF

Regina Beinker-Kutzleb, geb. Kutzleb

geboren am 30. August 1944 in Zürich/Schweiz

Ausbildung: 1951 - 1955	Grundschule in Neuss
1955 - 1964	Frauenoberschule in Neuss
Oktober 1964	Ergänzungsprüfung zur Erlangung der Hochschulreife
1964 - 1970	Studium der Biologie in Bonn, Tübingen und München mit Abschluß Diplom
Januar 1971	Beginn der Promotionsarbeit am Institut für Genetik der Uni- versität München

